

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Hidrogéis contendo nanoemulsões de genisteína:
Estudos de formulação, permeação e retenção cutânea da genisteína

BETHÂNIA ANDRADE DE VARGAS

PORTO ALEGRE, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Hidrogéis contendo nanoemulsões de genisteína:
Estudos de formulação, permeação e retenção cutânea da genisteína

Dissertação apresentada por **Bethânia
Andrade de Vargas** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26 de março de 2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Nadia Maria Volpato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ruy Beck
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

V297h Vargas, Bethânia Andrade de
Hidrogéis contendo nanoemulsões de genisteína: estudos de formulação, permeação e retenção cutânea da genisteína / Bethânia Andrade de Vargas.
– Porto Alegre : UFRGS, 2010. – xx, 83 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Nanoemulsões. 2. Hidrogéis. 3. Genisteína. 4. Isoflavonas. 5. Permeação cutânea. 6. Retenção cutânea. 7. Pele. I. Teixeira, Helder Ferreira. II. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606) da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da CAPES. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

À minha mãe

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde, pela força, pela fé e pelas pessoas e anjos que colocou no meu caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helder Teixeira, pela orientação, dedicação, compreensão e paciência.

À Prof. Dra. Nadia Maria Volpato, pelas oportunidades de aprendizado que contribuíram para construção desse trabalho.

À Prof. Dra. Tiana Tasca, do departamento de Análises da Faculdade de Farmácia, pela colaboração nos estudos de análise histológica.

À Prof. Dra. Mônica Cristina de Oliveira, do departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela colaboração nos experimentos de caracterização físico-química das nanoemulsões.

A todos os professores desta faculdade que contribuíram para minha formação e, conseqüentemente, para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do LDG Alexandre, Ângela, Bárbara, Cabral, Cristiane, Daiane, Francini, Gustavo, Hemiliano, Janine, Juliana C., Laura, Lísias, Pedro, Raquel, Renata, Regina, Samuel, Simone, Tiago, Ueiler e Vinícius pela amizade e convívio diário. E principalmente aos amigos Débora, Fabrício, Greice, Ingrid e Juliana B. que disponibilizaram o seu tempo para contribuir com o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação, em especial aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade, Aline e Rúbia, pela amizade, auxílio e trocas de conhecimento.

À minha melhor amiga Juliana, a Fernanda e a tia Lele por serem meu porto seguro, pelo carinho, amizade verdadeira e diversão proporcionada nos momentos de estresse.

Aos meus pais, por serem profissionais exemplares, pela formação que me proporcionaram, pelo amor, compreensão e apoio.

Aos meus irmãos e amigos, Rômulo e Fabiane, pelo apoio incondicional, pela força e por sempre acreditarem que eu conseguiria transpor qualquer obstáculo.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, órgão financiador da bolsa de estudos recebida durante a realização deste trabalho.

RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado o efeito das isoflavonas da soja, especialmente da genisteína (GEN), administrada topicamente, na prevenção do fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese. Esse efeito tem sido relacionado com a sua atividade inibidora de tirosina quinase e antioxidante. Recentemente, demonstramos um lento perfil de permeação da GEN *in vitro* (usando células de difusão de Franz) a partir de nanoemulsões através de pele de orelha suína (SILVA et al., *Pharmazie*, v. 64, p. 32-35, 2009). Entretanto, estudos relativos à distribuição da GEN através das camadas da pele ainda não foram realizados. Neste contexto, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição da GEN através da pele suína a partir de nanoemulsões, antes e após incorporação em hidrogéis de ácido acrílico, a fim de ajustar a viscosidade das mesmas para aplicação tópica. Nanoemulsões contendo GEN apresentaram valores de potencial ζ negativos e baixa viscosidade. Os hidrogéis derivados contendo as nanoemulsões de GEN demonstraram um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico. Um método isocrático de cromatografia líquida para determinar a GEN nas camadas da pele de orelha suína foi desenvolvido e validado. O método mostrou ser específico, linear, preciso e exato para a determinação da GEN nas camadas da pele de orelha suína (i.e. stratum corneum, epiderme e derme). Nas condições validadas, o perfil de permeação/retenção da GEN foi claramente influenciado pela natureza do núcleo oleoso empregado. Nanoemulsões constituídas de um núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média apresentaram uma permeação mais lenta e uma maior retenção da GEN na pele quando comparado com nanoemulsões contendo octildodecanol. A incorporação das nanoemulsões de GEN em hidrogéis aumenta a retenção da GEN, especialmente na epiderme. Tal resultado pode estar relacionado com o aumento da hidratação da epiderme como sugerido nas observações histológicas. Em conclusão, o conjunto dos resultados demonstra o efeito das formulações sobre a distribuição da GEN através das camadas da pele de orelha suína.

Palavras-chave: genisteína, permeação, retenção, validação, pele, nanoemulsão, hidrogéis.

ABSTRACT

Recent studies have shown the effect of soy isoflavones, especially genistein (GEN), topically administered, in preventing skin photoaging and photocarcinogenesis. This effect has been related to tyrosine kinase inhibition and antioxidant activities. Recently, we have demonstrated a slow permeation profile of GEN *in vitro* (using Franz type diffusion cells) from nanoemulsions through porcine ear skin (SILVA et al., *Pharmazie*, v. 64, p. 32-35, 2009). However, studies concerning the distribution of GEN in the skin layers have yet to be performed. In this context, the main purpose of this study was to evaluate the GEN distribution through the porcine skin from topical nanoemulsions, before and after their incorporation into acrylic acid-hydrogels, in order to have their viscosity adjusted to topical applications. Nanoemulsions containing GEN exhibit negative ζ -potential and low viscosity. The derived hydrogels containing GEN-loaded nanoemulsions presents non-Newtonian pseudoplastic behavior. An isocratic liquid chromatographic method to determine GEN in porcine ear skin layers was developed and validated. The method proved to be specific, linear, precise and accurate to determine GEN in the porcine skin layers (i.e. stratum corneum, epidermis and dermis). In the validated conditions, the GEN permeation/retention profile was clearly influenced by the nature of the oil core used. Nanoemulsions composed by a medium chain triglycerides oil core exhibit both a slower permeation and a higher retention profile of GEN as compared to octyldodecanol nanoemulsions. The incorporation of GEN-loaded nanoemulsion into hydrogels improved the GEN retention, especially in the epidermis. Such a result might be related to the increased hydration of epidermis as suggested in histological observations. In conclusion, the overall results show the effect of the formulation on distribution of GEN through the porcine skin layers.

Keywords: genistein, permeation, retention, validation, skin, nanoemulsion hydrogels.

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

| | | |
|----------|---|----|
| Table 1. | Linearity data of HPLC assay for genistein..... | 50 |
| Table 2. | GEN recovery using different amounts of methanol..... | 51 |
| Table 3. | Precision, accuracy and recovery data for skin samples..... | 52 |
| Table 4. | GEN concentration detected in receptor fluid and skin layers after 8h permeation..... | 53 |

Capítulo III

| | | |
|-----------|---|----|
| Figure 1. | Final composition (% w/w) of GEN-loaded nanoemulsions before and after incorporation into hydrogels..... | 65 |
| Figure 2. | Physicochemical properties of blank and GEN-loaded nanoemulsions..... | 70 |
| Figure 3. | GEN content (%) in nanoemulsions before and after incorporation in hydrogels (initial and after 30 days of storage at 4°C)..... | 72 |
| Figure 4. | GEN solubility in different solutions..... | 75 |
| Figure 5. | Cumulative amount of GEN permeated ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) through excised porcine skin from nanoemulsions before and after their incorporation in hydrogels... | 75 |
| Figure 6. | Amount of GEN retained ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) through excised porcine skin from nanoemulsions before and after their incorporation in hydrogels..... | 76 |

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

| | | |
|-----------|--------------------------------------|----|
| Figura 1. | Estrutura química da genisteína..... | 14 |
|-----------|--------------------------------------|----|

Capítulo II

| | | |
|-----------|--|----|
| Figure 1. | Representative chromatograms of specificity study. (A) Receptor fluid and genistein methanol solution. (B) Stratum corneum (C) Epidermis and (C) dermis-spiked with genistein-loaded nanoemulsion hydrogels. Dashed lines: non-spiked samples; Solid lines: Samples spiked with genistein-loaded nanoemulsion hydrogels..... | 49 |
|-----------|--|----|

Capítulo III

| | | |
|-----------|---|----|
| Figure 1. | Chemical structure of genistein..... | 63 |
| Figure 2. | Transmission electronic microscopy images of hydrogel containig GEN-loaded MCT (A) or ODD (B) nanoemulsions at 1mg/mL. (C) and (D) are images from nanoemulsions before incorporation in hydrogels..... | 71 |
| Figure 3. | Representative rheograms curves of the hydrogels containing GEN-loaded ODD (●,○) or MCT (◇,◆)-nanoemulsions. Solid and open symbols represent ascendant and descendant curves, respectively..... | 73 |
| Figure 4. | Representative spreadability curves of the hydrogels containing GEN-loaded ODD (●) or MCT (◆)-nanoemulsions..... | 74 |
| Figure 5. | Figure 5. Photomicrographs of skin after 8 h permeation kinetics (optical increase of 40-fold). Key: untreated skin (A); (B and C) Skin treated with GEN-loaded MCT or ODD nanoemulsions; (D and E) Skin treated with GEN-loaded MCT or ODD nanoemulsions incorporated in hydrogel..... | 78 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| Introdução..... | 01 |
| <hr/> | |
| Capítulo I | |
| Revisão da literatura..... | 09 |
| <hr/> | |
| Fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese..... | 11 |
| Isoflavonas e atividade antioxidante..... | 13 |
| Nanoemulsões..... | 17 |
| Permeação cutânea..... | 25 |
| <hr/> | |
| Capítulo II | |
| Hidrogéis contendo nanoemulsões de genisteína. Desenvolvimento e validação de um método de LC para determinar o perfil de permeação cutânea da genisteína..... | 39 |
| <hr/> | |
| Resumo..... | 41 |
| Artigo..... | 43 |
| Abstract..... | 44 |
| Introduction..... | 45 |
| Experimental..... | 46 |
| Results and Discussion..... | 49 |
| <hr/> | |
| Capítulo III | |
| Hidrogéis de uso tópico contendo nanoemulsões de genisteína. Estudos de formulação e permeação cutânea..... | 57 |
| <hr/> | |
| Resumo..... | 59 |
| Artigo..... | 61 |
| Abstract..... | 62 |
| Introduction..... | 63 |
| Experimental..... | 65 |
| Results and discussion..... | 70 |
| <hr/> | |
| Conclusões..... | 82 |
| <hr/> | |

INTRODUÇÃO

A pele está constantemente exposta a agressões provenientes do meio ambiente, as quais são capazes de alterar sua estrutura e função (MARROT et al., 2005). Diversos fatores ambientais e genéticos têm sido relacionados com o envelhecimento e o desenvolvimento do câncer de pele, sendo que a exposição crônica à radiação ultravioleta é considerada como um dos principais fatores (KATIYAR et al., 2006). Um dos mecanismos moleculares originados da ação da radiação ultravioleta é a indução direta de radicais livres e espécies reativas do metabolismo do oxigênio, ambos intimamente ligados ao fotoenvelhecimento e carcinogênese (MARROT et al., 2005; MARTI-MESTRES et al., 2007).

Estudos recentes têm descrito novas estratégias para reduzir os danos causados ao organismo pelo estresse oxidativo (DINKOVA-KOSTOVA, 2008). O dano oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento de diversas doenças que afetam a pele (F'GUYER et al. 2003). Moléculas de origem vegetal têm sido utilizadas visando limitar as conseqüências nocivas do sol sobre a pele (PINNEL, 2003). Alguns estudos relacionam essa atividade com a presença de compostos polifenólicos, como as isoflavonas, com ocorrência predominante na família Fabaceae (LIGGINS et al., 2000; SARTOR et al., 2002; DIXON e FERREIRA, 2002). A soja (*Glycine max*) é uma fonte rica nesses compostos, sendo que a genisteína é um dos compostos majoritários (HO et al., 2002). Esses compostos apresentam reconhecida atividade antioxidante, devido a sua capacidade de doar hidrogênio e inativar radicais hidroxil e superóxido (WIYARINI et al., 2006; LIN et al., 2008). Além disso, alguns estudos têm comprovado que a genisteína inibe a proteína tirosina quinase, responsável pela fosforilação protéica necessária para a regulação da divisão celular, podendo proteger assim a pele contra estresse oxidativo, imunossupressão e câncer (ULRICH, 2005).

Apesar das potencialidades da administração cutânea das isoflavonas da soja, como a genisteína, apenas alguns estudos descrevem o perfil de permeação destes compostos através da pele. Por exemplo, Minghetti et al. (2006) avaliaram o efeito de diferentes promotores de absorção sobre o perfil de permeação da genisteína em pele

humana utilizando células de difusão de Franz. Mais recentemente, Huang et al. (2008) demonstraram o efeito do pH sobre a permeação e retenção da genisteína em pele de camundongos nude. A genisteína em condições neutras (pH 6) demonstrou maior retenção na pele comparado com a forma ionizada (pH 10,8), demonstrando possivelmente uma maior permeação/retenção da forma não-ionizada devido às características lipofílicas do estrato córneo.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de nanoemulsões como carreadores de fármacos e/ou moléculas bioativas de uso tópico tem sido correntemente descritos na literatura (ZEEVI et al., 1994; EZRA et al., 1996; PIEMI et al., 1999; FANG et al., 2004; ALVES et al., 2005; YILMAZ; BORCHERT, 2005; SILVA, 2006; FASOLO et al., 2007). Nanoemulsões podem ser definidas como a dispersão de um núcleo oleoso de diâmetro nanométrico estabilizado por um sistema tensoativo adequado em uma fase aquosa externa. Moléculas de reduzida hidrossolubilidade encontram-se preferencialmente dispersas no núcleo oleoso e/ou adsorvidas na interface da nanoestrutura. O interesse pelo uso destes sistemas reside na possibilidade de melhoria de suas propriedades físicas, como espalhabilidade e oclusividade, na modulação da permeação de ativos cosméticos através das diferentes camadas da pele, ou ainda, no direcionamento a um sítio específico (TROTTA et al., 2002; VANDAMME, 2002; BOUCHEMAL et al., 2004; FANG et al., 2004).

Recentemente, demonstramos a viabilidade tecnológica de incorporação de genisteína em nanoemulsões de aplicação tópica constituídas de um núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média ou octildodecanol estabilizado por lecitina de gema de ovo (SILVA et al, 2007). Um estudo inicial demonstrou uma permeação lenta da GEN *in vitro* a partir destas formulações através da pele de orelha suína utilizando células de difusão de Franz (SILVA et al., 2009). Em continuidade, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a distribuição da genisteína a partir das nanoemulsões desenvolvidas nas camadas da pele de orelha suína *in vitro*, antes e após a sua incorporação em hidrogéis realizada com a finalidade de adequar a viscosidade dos sistemas a aplicação tópica. A dissertação está estruturada em três capítulos como segue:

- O capítulo I trata da revisão da literatura acerca do tema da dissertação, resumindo quatro aspectos principais tratados ao longo do trabalho, fotoenvelhecimento e carcinogênese, isoflavonas da soja e genisteína, nanoemulsões e permeação cutânea;

- O capítulo II apresenta os resultados experimentais relativos à validação de uma metodologia analítica por cromatografia líquida visando à determinação da genisteína nas diferentes camadas de pele de orelha suína a partir das formulações desenvolvidas;

- O capítulo III investiga o efeito da composição do núcleo oleoso das nanoemulsões tanto sobre as propriedades físico-químicas como sobre o perfil de permeação/ distribuição da genisteína *in vitro* nas camadas de pele de orelha suína a partir das formulações, antes e após a sua incorporação em hidrogéis.

Referências

ALVES, M. P., POHLMANN, A. R. e GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. *Pharmazie*, v. 60, p. 900–904, 2005.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International journal of pharmaceutics*, v. 280, p. 241-251.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T. Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: Versatility of effects and mechanisms. *Planta Medica*, v. 13, p. 1548-59, 2008.

DIXON, R.A. and FERREIRA, D. Genistein. *Phytochemistry*, v. 60, p. 205-211, 2002.

EZRA, R.; BENITA, S.; GINSBURG, I.; KOHEN, R. Prevention of oxidative damage in fibroblast cell cultures and rat skin by positively-charged submicron emulsion of α -tocopherol. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 42, p. 291-298, 1996.

F'GUYER, S., AFAQ, F., MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, v. 19, p. 56-72, 2003.

FANG, J-Y., LEU, Y-L., CHANG, C-C. Lipid nano/submicron emulsions as vehicles for topical flurbiprofen delivery. *Drug Delivery*, v.11, p. 97-105, 2004.

FASOLO, D., BASSANI, V. L., TEIXEIRA, H. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. *Pharmazie*, n. 64, p. 726-730, 2009.

HO, H.M.; CHEN, R.Y.; LEUNG, L.K.; CHAN, F.L.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 56, p. 289-295, 2002.

KATIYAR, S., ELMETS, C.A., KATIYAR, S. K. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 18, p. 287-296, 2006.

LIGGINS J., BLUCK L.J.C., COWARD W.A., BINGHAM S.A. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Anal Biochem*, v. 264, p. 1-7, 2000.

LIN, J. Y. Topical Isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, v. 24, p. 61-66, 2008.

MARROT, L., BELAÏDE, J.P., JONES, C., PEREZ, P., MEUNIER, J. R., Molecular responses to stress induced in normal human caucasian melanocytes in culture by exposure to simulated solar UV. *Photochemistry and Photobiology*, v. 81, p. 367-375, 2005.

MARTI-MESTRES, G., MESTRES, J.P., BRES, J., MARTIN, S., RAMOS, J. and VIAN L. The "in vitro" percutaneous penetration of three antioxidant compounds. *International Journal of Pharmacy*, v. 331, p. 139-144, 2007.

PIEMI, M.P.Y.; KORNER, D.; BENITA, S.; MARTY, J-P. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. *Journal of Controlled Release*, v. 58, p.177-187, 1999.

PINNEL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 48, p. 1-19, 2003.

- SARTOR L, PEZZATO E, DELL'AICA I, CANIATO R, BIGGINN S, GARBISA S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochemical Pharmacology*, vol. 15, p. 229-37, 2002.
- SILVA, A.P.C.; NUNES, B.R.; OLIVEIRA, M.C.; KOESTER, L.S.; MAYORGA, P.; BASSANI, L. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. *Pharmazie*, v. 64, p. 32-35, 2009.
- TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 53, p. 203-208, 2001.
- ULLRICH, S.E. Mechanisms underlying UV-induced immune suppression. *Mutation Research*, v. 571, p. 185-205, 2005.
- VANDAMME TF. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 21, p. 15-34, 2002.
- WIDYARINI, S. Estrogen receptor signaling protects against immune suppression by UV radiation exposure. *PNAS*, v. 34, p. 12837-12842, 2006.
- YILMAZ, E.; BORCHERT, H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema – An in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 307, p. 232-238, 2006.
- ZEEVI, A.; KLANG, S.; ALARD, V.; BROSSARD, F.; BENITA, S. The design and characterization of a positively charged submicron emulsion containing a sunscreen agent. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 108, p. 57-68, 1994.

CAPÍTULO I
Revisão da literatura

Fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese

A pele é um dos maiores e mais complexos órgãos do corpo humano desempenhando muitas e variadas funções. Sua estrutura está organizada em diversas camadas distintas, sendo as três principais: epiderme, derme e hipoderme. A principal função da epiderme é a produção do estrato córneo (EC) que é considerado como o principal responsável pela função de barreira exercida pela pele. A composição e a disposição do EC criam um caminho tortuoso para a entrada e saída de compostos e água do organismo (MENON, 2005). A pele também tem a função de proteger o corpo de agressores do ambiente externo como a poluição, temperatura, umidade e principalmente da radiação (AULTON, 2005). A radiação UV é dividida em três categorias dependendo do comprimento de onda, sendo a radiação UVB (280-320 nm) o principal fator etiológico da fotocarcinogênese (F'GUYER *et al.*, 2003; AFAQ *et al.*, 2005; PINNEL, 2003; KATIYAR, 2007).

O câncer de pele é a neoplasia humana de maior prevalência e incidência no mundo (ULRICH, 2005). No Brasil, ele corresponde a 25% dos tumores malignos registrados. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os cânceres de pele do tipo melanoma e não-melanoma são os tipos mais frequentes e têm grande impacto sobre a saúde pública. Sendo, o carcinoma basocelular, responsável por 70% dos diagnósticos de câncer de pele, o carcinoma epidermóide por 25% dos casos e o melanoma, detectado em 4% dos pacientes. O carcinoma basocelular (menos agressivo) e o epidermóide são também chamados de câncer de pele do tipo não-melanoma, enquanto o melanoma e outros tipos, com origem nos melanócitos, são denominados de câncer de pele tipo melanoma (VAYALIL *et al.*, 2003; INCA, 2008).

A fotocarcinogênese é complexa e multifatorial que se inicia pelo dano ao DNA das células da epiderme. Esse dano ao DNA pode ser observado pela formação de dímeros de pirimidina ciclobutano e pela fotoisomerização do ácido trans-urocânico para cis-urocânico no estrato córneo (YAROSH *et al.*, 1992; ZAK-PRELICH *et al.*, 2001; AFAQ *et al.*, 2006). Isso ocorre, pois tanto o DNA quanto do ácido cis-

urocânico, presentes nos queratinócitos da epiderme, absorvem a radiação UV, sendo considerados os principais fotorreceptores da pele (KELLY *et al.*, 2003; ULRICH, 2005). Diversos estudos têm sido demonstrado que o estresse oxidativo desencadeado pela radiação UV ativa uma proteína tirosina quinase na membrana plasmática de células da epiderme. A ativação desta proteína desencadeia uma série de eventos, como a liberação de citocinas, prostaglandinas e fatores de transcrição celular, que levam a imunossupressão UV-induzida e a fotocarcinogênese (ULRICH, 2005; WIDYARINI *et al.*, 2006).

Apesar do significativo progresso no desenvolvimento da terapia anticâncer, não existe um tratamento comum para todos os pacientes. Quimioterápicos como cisplatina, doxorubicina, 5-fluoracil e mitomicina são administrados pela via intravenosa e impedem que as lesões progridam e aliviam sintomas. Em alguns casos, a quimioterapia é adotada antes de tratamento cirúrgico e radioterapia. Agentes quimioterápicos atuam impedindo que as células se multipliquem rapidamente e o seu mecanismo de ação está relacionado com os seus efeitos adversos. A quimioterapia tradicional apresenta o problema de falta de direcionamento dos fármacos utilizados para o tratamento do tumor. Os quimioterápicos baseiam-se na premissa de que células cancerosas se multiplicam rapidamente e por isso são mais suscetíveis a sua citotoxicidade. Contudo, estes agentes têm muito pouca ou nenhuma especificidade, o que leva a toxicidade sistêmica, causando vários efeitos colaterais indesejáveis (OJIMA *et al.*, 2005).

A quimioprevenção representa uma nova e promissora estratégia, onde se faz o uso de agentes naturais ou sintéticos que controlam a ocorrência do câncer, podendo prevenir, desacelerar, reverter, ou ainda, interromper o câncer. A quimioprevenção difere da quimioterapia tradicional, pois o seu principal objetivo é diminuir a taxa de início do câncer e conseqüentemente, sua incidência. Nos últimos anos, o uso de compostos naturais presentes na alimentação e consumidos pela população humana tem recebido considerável atenção e uma literatura crescente tem descrito esses resultados (MUKTHAR *et al.*, 2002).

Estudos epidemiológicos têm indicado uma relação entre ação estrogênica e uma menor incidência de câncer de pele. Alguns estudos demonstraram que mulheres apresentam um menor risco de desenvolver câncer de pele do tipo não melanoma do que homens (PRESTON *et al.*, 1992; FOOTE *et al.*, 2001; BARNES *et al.*, 1995). Observou-se também que populações com dieta rica em *Glicine max* (soja) apresentam menor incidência de fotocarcinogênese. Estudos *in vivo* mostram que a ação dos fitoestrógenos sobre os receptores estrogênicos parece modular a resposta imunológica, ativando proteínas antioxidantes, diminuindo assim a imunossupressão UV-induzida. Contudo, os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente esclarecidos (WIDYARINI *et al.*, 2006).

Isoflavonas e atividade antioxidante

As isoflavonas são compostos polifenólicos com ocorrência predominante na família *Leguminosae* abundantes na soja, lentilha e no grão de bico, os quais são componentes usuais da dieta (BREINHOLT *et al.*, 2000; DIXON *et al.*, 2002). Entretanto, estima-se que o consumo de isoflavonas pela população ocidental seja 20-50 vezes menor quando comparada ao consumo da população asiática (HAWRYLEWIEZ *et al.*, 1995). A soja tem sido utilizada na medicina tradicional chinesa há milhares de anos, bem como para o tratamento e cuidados com a pele. Pesquisas avançadas com pele têm demonstrado que a soja e isoflavonas como a genisteína são eficazes na redução de danos cutâneos causados pelo sol (CHIU, 2009).

A genisteína (4',5,7-trihidroxisoflavona) é um fitoestrógeno, pertencente à classe das isoflavonas, descrita pela primeira vez em 1931 e presente em grande quantidade nas sementes da soja. Seu efeito estrogênico deve-se ao fato da genisteína apresentar estrutura química semelhante ao 17- β -estradiol, ligando-se a receptores β -estrogênicos (COOKE *et al.*, 2006). Além disso, em vários estudos tem sido comprovado que a genisteína inibe a proteína tirosina quinase, a qual é responsável pela fosforilação protéica necessária para a regulação da divisão celular, protegendo assim a pele contra estresse oxidativo, imunossupressão e câncer (ULRICH, 2005).

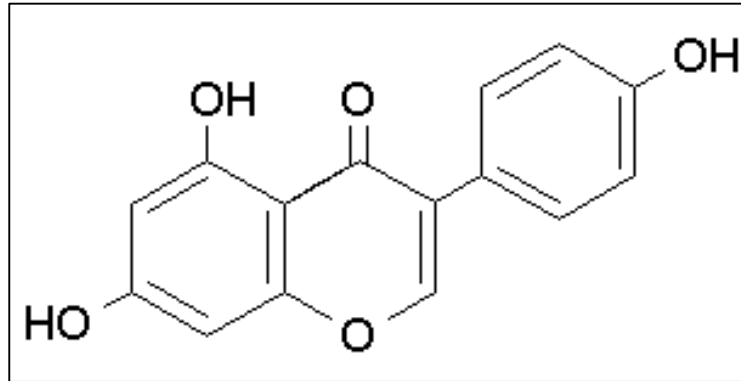


Figura 1. Estrutura química da genisteína

Contudo, a forma heterosídica da genisteína é inativa quando aplicada topicamente, sendo necessária a sua conversão à forma de aglicona, sua forma livre e bastante instável, para ligação ao receptor através de enzimas hidrolíticas presentes no intestino (glucosidases). (WEI et al., 2002; PINNEL, 2003).

As isoflavonas, como a genisteína, apresentam atividade antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (BERGENDI et al., 1999). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água pela citocromo oxidase, podendo ser convertido a intermediários reativos como o radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). São também espécies reativas do oxigênio o oxigênio singlete (1O_2), o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio (O_3) (HALLIWELL et al., 2000).

Os radicais livres e as ERMO's participam de processos fisiológicos importantes, como a destruição de microrganismos (BERGENDI et al., 1999). Entretanto, quando são formados em excesso, são capazes de causar danos a vários constituintes celulares, como DNA, proteínas e lipídios, causando envelhecimento

cutâneo e muitas outras doenças (KAWANISH et al., 2001). Entre as defesas enzimáticas presentes nos queratinócitos da pele incluem-se a superóxido dismutase, a catalase, a tioredoxina redutase e a glutatona peroxidase; e antioxidantes não enzimáticos como o α -tocoferol, a glutatona e o ácido ascórbico (AFAQ et al., 2005).

O dano oxidativo desempenha importante papel em processos patológicos e está envolvido diretamente no desenvolvimento de doenças que afetam a pele (F'GUYER et al., 2005). A pele é o maior órgão humano e está constantemente exposta a agressões provenientes do meio ambiente, as quais são capazes de alterar sua estrutura e função (MARROT et al., 2005). Apesar de vários fatores ambientais e genéticos estarem envolvidos no desenvolvimento de câncer de pele, a exposição crônica à radiação UV é um agente etiológico importante (KATIYAR et al., 2006). Um dos mecanismos moleculares e efeitos biológicos do UV é a indução direta de radicais livres e ERMO's, ambos intimamente ligados ao processo de fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (MARROT et al., 2005). Tanto a radiação UVA quanto a UVB induzem reações deletérias na pele humana que podem causar estresse oxidativo e conseqüentemente, envelhecimento, imunossupressão, carcinogênese e várias doenças inflamatórias. Antioxidantes, como a genisteína, protegem o organismo da ação danosa dos radicais livres (MARTI-MESTRES et al., 2007).

Apesar do grande número de estudos existentes sobre a atividade antioxidante de muitos isoflavonóides através da análise de parâmetros indiretos como a inibição de danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA, o mecanismo antioxidante pelo qual as isoflavonas agem não está completamente elucidado. Em um estudo promovido por GUO e colaboradores (2002), em células endoteliais de cordão umbilical humano, foi testada a eficácia das isoflavonas genisteína na captura de várias moléculas, como, por exemplo, dos radicais hidroxil, superóxido e óxido nítrico. A genisteína não demonstrou atividade direta significativa como capturadora desses radicais, o que indica que o mecanismo principal pelo qual esta possui ação antioxidante não deve ser por captura de radicais livres (GUO et al., 2002).

Entretanto, a genisteína parece possuir uma atividade mais pronunciada quando a espécie reativa de oxigênio em questão é o peróxido de hidrogênio. Em um estudo utilizando lipossomas multilamelares constituídos por fosfatidilcolina (FC) e adicionados de genisteína em uma concentração de 25nmol/mg de FC observou-se uma inibição de 50% na oxidação desses lipossomas quando expostos à radiação UVA e UVB, sendo que o mecanismo antioxidante parece ser pela captura de peróxido de hidrogênio (RECORD et al., 1995). Outro mecanismo possível para explicar a atividade antioxidante das isoflavonas pode ser a habilidade destas em estabilizar membranas através da diminuição da fluidez das mesmas. Arora e colaboradores (2002) sugerem que os isoflavonóides, assim como o colesterol e α -tocoferol, distribuem-se no interior hidrofóbico das membranas celulares, causando uma diminuição drástica na fluidez da membrana, o que poderia estericamente impedir a difusão de radicais livres e diminuir a cinética das reações promovidas por esses compostos.

Também é possível que a ação antioxidante das isoflavonas esteja relacionada com a sua capacidade de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes. Wei e colaboradores, em 1995, verificaram que a administração oral de genisteína por um período de 30 dias em camundongos, aumentou a atividade de importantes enzimas antioxidantes na pele e outros órgãos. O peróxido de hidrogênio é gerado, na pele, como uma resposta aguda à radiação UVB. A aplicação tópica de 10 μ mol de genisteína 1 hora antes da exposição a radiação solar inibe em mais de 50% a produção de H₂O₂ induzida por UVB nos camundongos testados, possivelmente através de sua atividade capturadora de H₂O₂ ou pela inibição do recrutamento de células inflamatórias (WEI et al., 2003). Em outro estudo, o pré-tratamento tópico de camundongos 10 minutos antes da exposição com 10 μ mol de genisteína inibiu moderadamente o dano oxidativo em aproximadamente 30% na pele dos camundongos expostos à radiação por uma semana (total de três exposições) e em 50% naqueles animais expostos à radiação por duas semanas (total de seis exposições) (WEI et al., 2003). Wei e colaboradores (2002) também conduziram experimentos a fim de avaliar o efeito da genisteína nos danos oxidativos causados pela radiação UVB no DNA

celular, utilizando como marcador biológico, 8-OHdG (8-hidróxi-desoxiguanosina), o qual é normalmente usado como medida de danos oxidativos ao DNA em estudos de envelhecimento. Segundo os experimentos realizados por Wei e colaboradores (2002), a exposição subaguda à radiação UVB praticamente triplicou os níveis de 8-OHdG na epiderme dos camundongos nus e também provocou um aumento substancial nos níveis dessa base oxidada em órgãos vitais. A aplicação tópica de 10 μ mol de genisteína reduziu substancialmente a formação de 8-OHdG na epiderme dos camundongos expostos subaguda e cronicamente à radiação UVB, e no cérebro, fígado e baço dos animais expostos cronicamente (WEI et al., 2002).

Apesar da genisteína inibir substancialmente a formação de 8-OHdG na pele de camundongos, ela não demonstrou nenhum efeito significativo sobre a formação de dímeros de pirimidina, induzidos pela radiação UV, no DNA das células desses mesmos animais, indicando que essa substância possui uma atividade seletiva no que se relaciona à inibição de danos ao DNA. Assim, a propriedade da genisteína em inibir a formação de lesões do tipo 8-OHdG no DNA não parece estar relacionada a uma interferência na transmissão da radiação UV, podendo ser então explicada pela sua atividade antioxidante (WEI et al., 2002).

Nanoemulsões

Nos últimos anos, o uso de nanoemulsões como veículo para administração tópica de compostos bioativos de reduzida hidrossolubildiade tem sido extensivamente estudado. Diversos estudos demonstraram a incorporação de fármacos de diferentes classes terapêuticas nesses sistemas (DUNCAN et al., 1990; FRIEDMAN et al., 1995; PIEMI et al., 1999). Nanoemulsões são dispersões compostas de gotículas oleosas de tamanho geralmente entre 100 e 300nm em uma fase externa aquosa, as quais são estabilizadas por tensoativos e co-tensoativos adequados. Moléculas de reduzida hidrossolubilidade encontram-se preferencialmente no interior da gotícula de óleo e/ou adsorvidas na interface da nanoestrutura. Apresentam-se como líquido de aspecto leitoso e pouco viscoso (FRONZA et al., 2004; SAKULKU et al., 2009).

Nanoemulsões de uso tópico apresentam diversas aplicações, incluindo a administração tópica de fármacos, visando tanto uma atividade sistêmica quanto uma atividade local. Essas formulações apresentam vantagens para aqueles fármacos pouco solúveis em água, visto que a nanoemulsão pode proporcionar um aumento da solubilidade aparente de fármacos lipofílicos. Isto, juntamente com as características físico-químicas apresentadas por estas formulações, pode promover um aumento da permeação transdérmica e um maior tempo de permanência do fármaco na pele (BENITA, 1999; ALVES et al., 2007; FASOLO et al., 2007; FASOLO et al., 2009; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009; RUKTANONCHAI et al., 2009). Outras vantagens apresentadas por estes sistemas, quando de uso tópico, são a modulação da barreira do estrato córneo, controlando a penetração cutânea; o aumento da interação do ativo com a pele, devido à grande área superficial e a baixa tensão superficial das gotículas de óleo e o aumento da estabilidade química do ativo (ALVES et al., 2007; FASOLO et al., 2007; FASOLO et al., 2009; JUNYAPRASERT et al., 2009).

A extensão da permeação das moléculas através da pele, o tempo, e ainda o direcionamento a sítios específicos podem ser influenciados pelas matérias-primas utilizadas. Os principais componentes das nanoemulsões são os óleos e os tensoativos. Óleos de origem vegetal e/ou semi-sintéticas constituídos principalmente de triglicerídeos têm sido correntemente utilizados para compor a fase interna da nanoemulsão (ZEEVI et al., 1994; FRIEDMAN et al., 1995; EZRA et al., 1996; BENITA, 1999; PIEMI, et al., 1999; ALVES et al., 2005; PRIMO et al., 2006; ALVES et al., 2007; PRIMO et al., 2008; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; HATZIANTONIOU et al., 2007). Lecitinas de ovo e de soja, as quais são misturas de fosfolípidos, são tensoativos de origem natural amplamente usados para compor a interface óleo/água desses sistemas, por serem atóxicos, biocompatíveis e agentes estabilizadores das formulações (ZEEVI et al., 1994; FRIEDMAN et al., 1995; SCHWARZ et al., 1995; SCHWARZ et al., 1996; EZRA et al., 1996; BENITA, 1999; FANG et al., 2004; YILMAZ et al., 2005; YILMAZ et al., 2006; PRIMO et al., 2006; PRIMO et al., 2008; SILVA et al., 2006; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009; FASOLO et al., 2007; FASOLO et al., 2009; HATZIANTONIOU et al., 2007).

As propriedades físico-químicas como diâmetro de gotícula, potencial zeta, viscosidade, pH e tensão superficial são avaliadas, pois caracterizam as nanoemulsões e podem influenciar a extensão da absorção, sendo influenciadas pelo óleo formador do núcleo oleoso e pelo tensoativo utilizado na formulação bem como pela técnica de preparo.

O núcleo oleoso das nanoemulsões corresponde de 5 a 20% do total da formulação e o óleo a ser utilizado e a sua concentração depende da solubilidade do fármaco nestes componentes. Os triglicerídeos de cadeia média (TCM), frequentemente o Miglyol[®] (triglicerídeo cáprico/caprílico), são os óleos mais empregados para o preparo destas dispersões. Trabalhos com betametasona (dipropionato), diclofenaco dietilamônio, indometacina, piroxicam, diazepam, benzofenona-3, nimesulida, coenzima Q-10, ftalocianina de zinco, ceramida e ácido lipóico, utilizam Miglyol[®] na composição de suas nanoemulsões (FRIEDMAN et al., 1995; FERNANDEZ et al., 2000; ALVES et al., 2005; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; HATZIANTONIOU et al., 2007; PRIMO et al., 2008; RUKTANONCHAI et al., 2009). TCM são ésteres constituídos de três ácidos graxos, com 8 a 12 átomos de carbono, unidos ao glicerol, sendo cerca de 100 vezes mais solúveis em água do que os triglicerídeos de cadeia longa (TCL), menos empregados, e assim os TCM conseguem dissolver quantidades elevadas de fármacos lipossolúveis (MUCHTAR e BENITA et al., 1994). Esses óleos são considerados seguros para a via cutânea (TRAUL et al., 2000). Octildodecanol (ODD), um álcool graxo, tem sido mais recentemente descrito na literatura, para a formação do núcleo oleoso de nanoemulsões. A permeação cutânea dos flavonóides genisteína, quercetina e 3-o-metilquercetina foi avaliada a partir de formulações constituídas de TCM ou ODD como núcleo oleoso, observando-se uma permeação superior dos flavonóides através da pele com a utilização de ODD em comparação com TCM (SILVA et al., 2007; FASOLO et al., 2009). Vaselina, parafina, óleo de jojoba, óleo de citronela e miristato de isopropila também são descritos como núcleo oleoso em nanoemulsões de uso tópico, contudo, menos frequentemente (FRIEDMAN et al., 1995; SCHWARZ et al., 1996; FANG et al., 2004; SAKULKU et al., 2009).

A interface óleo/água das nanoemulsões é composta de tensoativos, que tem por principal função estabilizar a estrutura formada (YILMAZ et al., 2005). A seleção de tensoativos, juntamente com a otimização do processo de emulsificação e a seleção adequada da fase dispersante, é de grande importância para a estabilidade das nanoemulsões (SAKULKU et al., 2009). Um dos tensoativos mais empregados são as lecitinas, as quais são misturas complexas de fosfolipídios extraídos da gema de ovo ou da soja, cujo componente majoritário é a fosfatidilcolina (BENITA, 1998; KIBBE et al., 2000), empregadas na concentração de 1,0 a 3% para emulsões contendo de 5 a 20% de fase interna. Lecitinas exibem um alto valor de potencial zeta negativo sendo capazes de prevenir a coalescência das gotículas sobre colisões aleatórias, sendo agentes estabilizadores das nanoemulsões. Além de serem biocompatíveis e não tóxicas, também possuem propriedades hidratantes para a pele e, ainda, podem constituir um adequado sistema de liberação de fármacos (SCHMID et al., 1993).

Em alguns trabalhos, as lecitinas são empregadas como único sistema tensoativo, como no caso de nanoemulsões contendo genisteína, quercetina e 3-o-metilquercetina, ftalocianina de zinco e ceramida (SILVA et al., 2006; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009; FASOLO et al., 2007; HATZIANTONIOU et al., 2007; PRIMO et al., 2008), apesar de sua composição heterogênea poder causar variabilidade na estabilidade das formulações. Outros estudos descrevem o uso de lecitinas associadas à tensoativos sintéticos (co-tensoativos) como polissorbato 80 (FRIEDMAN et al., 1995; YILMAZ et al., 2005; YILMAZ et al., 2006) cremophor EL® (FRIEDMAN et al., 1995; SCHWARZ et al., 1996) e poloxamero (ZEEVI et al., 1994; EZRA et al., 1996; BENITA, 1999; PIEMI et al., 1999; PRIMO et al., 2006). Outras combinações de tensoativos são descritas, como no estudo com nimesulida, em que foi empregado monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 na composição da nanoemulsão (ALVES et al., 2005). Também são descritos na literatura nanoemulsões de uso tópico estabilizadas por outros tensoativos como Tego®, Care 450®, Montanov® 82, Pluronic F-68® e Tween 80®, como único sistema tensoativo (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; HATZIANTONIOU et al., 2007; PRIMO et al., 2008; SAKULKU et al., 2009; RUKTANONCHAI et al., 2009).

Estearilamina, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e fitoesfingosina são exemplos de tensoativos utilizados em nanoemulsões para conferir carga positiva a estas devido aos grupamentos amônio ionizados, de maneira pH dependente ou não (EZRA et al., 1996; BENITA, 1999; PIEMI et al., 1999; YILMAZ et al., 2005). Nanoemulsões com elevado valor de potencial zeta positivo são descritas na literatura, uma vez que sistemas com carga positiva podem aumentar a permeabilidade de fármacos pouco hidrossolúveis, e ainda, prolongar o efeito farmacológico (EZRA et al., 1996; PIEMI et al., 1999). A combinação de estearilamina, lecitina e poloxamer aparece descrita em vários estudos visando obter formulações carregadas positivamente (ZEEVI et al., 1994; EZRA et al., 1996; PIEMI et al. 1999; BENITA et al., 1999).

O diâmetro de gotícula é uma das importantes propriedades avaliadas das nanoemulsões. A técnica mais empregada para analisar esta propriedade é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também conhecida como espalhamento de luz dinâmico. Técnicas complementares a esta, como microscopia eletrônica de transmissão (MET), têm sido empregadas para avaliar a morfologia e o tamanho das gotículas (FRIEDMAN et al., 1995; HATZIANTONIOU et al., 2007; RUKTANONCHAI et al., 2009; ALVES et al., 2007). Nanoemulsões possuem tamanho de gotícula normalmente compreendido entre 100 a 300nm, no entanto, encontram-se descritas na literatura nanoemulsões de uso tópico com tamanho de partícula de 35nm e 334nm (SAKULKU et al., 2009). O tamanho de gotícula nanométrico garante um contato próximo com o estrato córneo (ALVES et al., 2007), além de ser importante para a estabilidade das preparações (SCHWARZ et al., 1996). A composição da formulação e o procedimento de emulsificação exercem grande influência sobre o diâmetro médio das gotículas. O índice de polidispersão (IP) é outra propriedade analisada juntamente com o diâmetro médio de gotícula, e analisa a distribuição das partículas. Valores de IP inferiores a 0,3 indicam uma boa homogeneidade das gotículas na amostra. Geralmente, em nanoemulsões de uso tópico, o ideal é a distribuição apresentar-se de forma monodispersa, ou seja, com uma dispersão uniforme do diâmetro das nanopartículas (ALVES et al., 2007).

O potencial zeta é um parâmetro fundamental para a avaliação da carga de superfície das partículas nas nanoemulsões, podendo fornecendo informações sobre a estabilidade do sistema. Valores de potencial zeta maiores que 30mV, em módulo, garantem repulsão entre as gotículas evitando assim floculação e coalescência (YILMAZ et al., 2005; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; RUKTANONCHAI et al., 2009). A sua determinação é realizada, normalmente, através de técnicas eletroforéticas específicas, e reflete a composição da interface, além de poder estar relacionada com a concentração de fármaco na interface óleo/água (TAGNE et al., 2008).

Como descrito anteriormente, a lecitina é um dos tensoativos mais empregados, e devido aos fosfolipídeos carregados negativamente, tais como, ácidos fosfatídicos e fosfatidilserina, essas formulações apresentam elevado potencial zeta negativo em pH próximo da neutralidade, sendo encontrados na literatura valores que variam de, aproximadamente, -39mV a -50mV (SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009; PRIMO et al., 2008). A adição de ácido oléico em formulações é descrita por este ácido graxo localizar-se na interface de nanoemulsões, ionizando-se no pH das formulações, conduzindo a elevados valores de potencial zeta negativo, podendo alcançar valores próximos a -99 mV, atuando como bom estabilizador do sistema (FANG et al., 2004). Por outro lado, nanoemulsões podem apresentar elevado potencial zeta positivo através do uso de tensoativos catiônicos como a estearilamina e brometo de cetiltrimetilamonio. Estearilamina conduz a valores de potencial zeta próximos a 50mV em nanoemulsões (ZEEVI et al., 1994). Fitoesfingosina, um co-tensoativo, é outro componente que conduz a valores positivos de potencial zeta por apresentar seus grupos amino protonados em pH inferiores a 9 (YILMAZ et al., 2005). Valores de 35 a 38mV foram encontrados em nanoemulsões, com o uso de fitoesfingosina, conduzindo a uma boa estabilidade do sistema além de seu uso ter sido crucial para melhoria da umidade e elasticidade da pele pela ligação dos grupamentos positivos da molécula com a superfície da pele carregada negativamente que propicia um aumento da penetração dos lipídios no estrato córneo (YILMAZ et al., 2006).

O pH pode afetar consideravelmente a carga de superfície de nanoemulsões e conseqüentemente a estabilidade destes sistemas, podendo afetar também o tamanho das gotículas (YILMAZ et al., 2005). O pH final das nanoemulsões deve levar em consideração diversos aspectos, incluindo, a estabilidade da forma farmacêutica, a estabilidade do fármaco no veículo, e a via de administração. Para a aplicação cutânea, o pH das formulações geralmente encontra-se da neutralidade a levemente ácido (ALVES et al., 2007).

Apesar da grande importância para o desenvolvimento de formulações de uso tópico, a avaliação da viscosidade de nanoemulsões tem sido pouco descrita na literatura. A sua determinação pode ser realizada por viscosímetro de Brookfield e mais frequentemente por viscosímetro capilar (SCHWARZ et al., 1996; ALVES et al., 2005; FASOLO et al., 2007; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009; SAKULKU et al., 2009). A viscosidade é influenciada pela composição das nanoemulsões e por parâmetros como a concentração da fase interna (JUMMA et al. 1998), o diâmetro de gotícula (SILVENDER et al., 2003; SILVA et al., 2006) e a viscosidade do óleo formador do núcleo oleoso (JUMMA et al. 1998; CHUNG et al., 2001). Silva (2009) desenvolveu nanoemulsões contendo genisteína e encontrou valores de viscosidade de 1,54 cP utilizando triglicerídeos de cadeia média como óleo formador do núcleo oleoso e 1,81cP quando utilizou ODD como óleo. Fasolo (2007) encontrou valores de viscosidade similares ao incorporar diferentes ativos na formulação, com quercetina a viscosidade foi 1,96cP e com metilquercetina foi de 1,99cP. Nestes estudos descritos acima, a viscosidade dos óleos empregados (ODD e TCM) parecem exercer uma influência sobre a viscosidade das nanoemulsões, o que pode estar relacionado com a viscosidade dos óleos (viscosidade de 58 a 64cP para ODD e de 25 a 33cP para TCM) (SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009). Não obstante, a determinação da viscosidade também é indicativo da estabilidade física das formulações (PRINDERRE, 1998). A viscosidade das nanoemulsões é uma característica desfavorável à aplicação tópica, uma vez que a maioria dos produtos dermatológicos e cosméticos apresentam comportamento plástico não newtoniano e para ser conveniente à aplicação tópica a viscosidade deve ser cerca de pelo menos 100cP (SCHWARZ et al., 1995).

A preparação de nanoemulsões espessadas com polímeros tem sido descrita em alguns estudos visando adequar a viscosidade das nanoemulsões a aplicação tópica. Entre estes polímeros utilizados, destaca-se o Carbopol 940® que é um polímero hidrossolúvel bastante usado para aumentar a viscosidade de emulsões (SCHWARZ et al., 1996; ALVES et al., 2005; YILMAZ et al., 2005; YILMAZ et al., 2006). Nesses estudos, as nanoemulsões são preparadas e incorporadas no gel de carbopol 940®, o pH é neutralizado com trietanolamina (SCHWARZ et al. 1995; ALVES et al., 2005) e conservantes como metilparabeno e propilparabeno são utilizados (ALVES et al., 2005). Outros espessantes, como a goma xantana, também são descritos na literatura (SCHWARZ et al. 1995). As nanoemulsões após espessadas normalmente apresentam-se como fluido não-newtoniano (ALVES et al., 2005) e ainda com comportamento plástico ou pseudo-plástico tornando-se ideais para aplicação tópica (SCHWARZ et al. 1995). Frequentemente, nanoemulsões espessadas com carbopol, para adequação ao uso tópico, normalmente tem seu pH ajustado com trietanolamina em torno de 5,5 a 8,0 (SCHWARZ et al., 1996). O pH final das formulações é determinado após adequada diluição das amostras, normalmente com o uso de potenciômetro (SILVA et al., 2007; FASOLO et al., 2007; ALVES et al., 2007).

JUNYAPRASERT e colaboradores (2009) relataram o uso goma xantana como espessante de nanoemulsões. O estudo de estabilidade realizado com as nanoemulsões espessadas demonstra que os valores de potencial zeta não são afetados após a incorporação no hidrogel. Isto ocorre devido às cargas similares negativas da goma xantana e da nanoemulsão, sendo que os valores não se alteraram para a formulação antes e após adequação ao uso tópico (espessamento com goma xantana).

A tensão superficial é outro parâmetro importante na caracterização de nanoemulsões de uso tópico, pois está diretamente relacionada à espalhabilidade, podendo-se dizer que produtos com reduzida tensão superficial se espalham melhor nas superfícies e que quanto maior é esta espalhabilidade entre sólidos e líquidos, maior é a atração ou adesão entre estes. Portanto, é um parâmetro que pode relacionar a interação e conseqüentemente a penetração da nanoemulsão na superfície da pele.

Conceitualmente é um parâmetro que fornece a medida quantitativa da redução de superfície, e pode ser interpretado como uma força por unidade de comprimento que se opõe ao aumento da superfície (NETZ et al., 2002). Geralmente, a tensão superficial de nanoemulsões pode ser considerada baixa (em relação à água) sendo determinada pelos tensoativos estabilizadores do filme interfacial. Os estudos de tensão superficial podem ser acompanhados da avaliação do ângulo de contato e da espalhabilidade (YILMAZ et al., 2005). Esses autores desenvolveram duas formulações para uso tópico na pele contendo ceramidas 3 e 3B: uma carregada positivamente (NP) e outra negativamente (NN), e avaliaram a tensão superficial, viscosidade, espalhabilidade e ângulo de contato. Os resultados obtidos demonstraram que a NP teve uma maior capacidade de espalhabilidade na superfície cutânea que a NN, causando uma maior interação das nanogotículas carregadas positivamente com a pele, conduzindo a um aumento das propriedades de espalhamento e da penetração das ceramidas na pele.

Permeação cutânea

A pele atua como revestimento protetor e fronteira entre o organismo e o ambiente, evitando a penetração de substâncias exógenas (GODIN et al., 2007). Na epiderme encontra-se o estrato córneo, que é a camada mais externa da pele, composta por células queratinizadas e anucleadas, e envolta por uma camada lipídica composta de ácidos graxos, triglicerídeos, ceras, colesterol, esqualeno, outros hidrocarbonetos e esteróides (HADGRAFT et al., 2005). O estrato córneo apresenta como papel fisiológico a hidratação cutânea, a proteção do meio interno, a proteção contra agentes externos, a permeabilidade seletiva aos agentes externos, entre outros. É uma região complexa, rica em lipídios e pode ser comparada a uma parede de tijolos e argamassa (GODIN et al., 2007). Sendo assim, regiões hidrofílicas e lipofílicas são encontradas no interior desta matriz tornando o estrato córneo a principal barreira na absorção percutânea de fármacos aplicados topicamente (YILMAZ et al., 2006). A penetração de fármacos através da pele, pode ser descrita pelas leis da difusão e a partição do fármaco na interface formada entre a formulação e a camada córnea, sendo um determinante físico dominante no controle da absorção (HADGRAFT et al., 2005).

A integridade do estrato córneo, as características físico-químicas das substâncias ativas, como pH, viscosidade, grau de lipofilia e coeficiente de partição, além do veículo e da forma farmacêutica ou cosmética também influenciam a penetração/absorção. A penetração e a permeação de diferentes componentes ativos de baixa absorção podem ser aumentadas através de algumas alternativas como a adição de promotores específicos na formulação ou, como correntemente relatado nos últimos anos, através do uso de sistemas de liberação como as nanoemulsões. A inclusão de promotores químicos, usualmente solventes orgânicos, tem sido geralmente associado à irritação, toxicidade e sensibilização da pele (AMSELEM e FRIEDMAN). Para avaliar esta extensão da absorção e sua quantificação nas diversas camadas da pele, estudos de difusão em células de Franz têm sido amplamente utilizados (FRIEDMAN et al., 1995; FERNANDEZ et al., 2000; FANG et al., 2004; ALVES et al., 2005; ALVES et al., 2007; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; PRIMO et al., 2008; RUKTANONCHAI et al., 2009; FASOLO et al., 2009) e são de grande importância visto as características deste órgão, do qual o estrato córneo é a principal barreira para a absorção das substâncias (SHAH et al., 1994; BOUWSTRA et al., 2002; YILMAZ et al., 2006; HADGRAFT et al., 2005; GODIN et al., 2007; ALVES et al., 2007).

Nanoemulsões têm sido amplamente descritas como um veículo para a liberação de fármacos pouco hidrossolúveis na pele, para vários fins, como tendo efeito na superfície (protetores solares, cosméticos e antiinflamatórios), efeito cutâneo (corticoesteroides) e efeito sistêmico (antiinflamatórios não esteroidais) (JUNYAPRASERT, 2009). Tais sistemas podem representar uma estratégia para a redução da toxicidade sistêmica, reduzindo efeitos colaterais de diversos fármacos potentes (YILMAZ et al., 2006), e ao mesmo tempo, restringindo os efeitos desejados para tecidos específicos (BONNA, 1995). Além disso, podem aumentar a taxa de permeação na pele e melhorar a ação tópica devido à sua associação com a superfície da pele e ao pequeno tamanho de partícula, prolongando assim o tempo de permanência devido à sua grande área superficial e à baixa tensão superficial das gotículas de óleo (SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009; FASOLO et al., 2007).

As propriedades físico-químicas das nanoemulsões formadas, como diâmetro de partícula, carga de superfície, tensão superficial e viscosidade, podem exercer influência na velocidade e extensão da permeação na pele (BENITA, 1999). O seu reduzido diâmetro de gotícula apresenta-se como vantagem em relação aos sistemas convencionais de uso tópico, pois permite a aplicação de um depósito uniforme na pele resultando em uma elevada superfície de contato do sistema com este órgão.

Difusão em células de Franz é um método *in vitro* para avaliação da absorção percutânea de fármacos e moléculas. Nestes estudos, primeiramente a pele é preparada podendo ser realizado um corte com o uso de um dermatômetro para padronizar a espessura dos cortes, selecionando a epiderme e grande parte da derme (BRONAUGH, 1995). Normalmente utiliza-se a pele de orelha suína para este estudo por esta ser semelhante à pele humana quanto à composição lipídica, permeabilidade e coeficiente de partição. Também pode ser utilizado pele de rato e humana (PIEMI et al., 1999; ALVES et al., 2005). A formulação é colocada no compartimento doador e permanece diretamente em contato com a pele (estrato córneo). A pele separa o compartimento doador do receptor. No compartimento receptor é colocado um fluido receptor que normalmente é uma solução fisiológica na qual a substância teste é solúvel a fim de garantir condição sink. Esta solução é mantida sob agitação, normalmente com o uso de agitadores magnéticos a 700rpm, e aquecimento (~37°C). As coletas são realizadas a partir do fluido receptor em tempos pré-determinados para a quantificação da amostra que normalmente é feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O meio do compartimento receptor é sempre repostado após a coleta (WHO, 2006).

Técnicas complementares podem ser realizadas para a quantificação das substâncias ativas na pele como, por exemplo, o tape-stripping, em que se utilizam fitas adesivas para separar o estrato córneo da epiderme e avaliar a quantidade de substância presente na fita através de técnicas de doseamento (ALVES et al., 2007; PRIMO et al., 2008). A homogeneização de tecido em solvente apropriado também é outra técnica utilizada para quantificação de ativos na derme e epiderme (FANG et al., 2004; PRIMO et al., 2008).

Neste contexto, Pieme e colaboradores (1999) investigaram o efeito da permeação *in vitro* do nitrato de econazol e nitrato de miconazol, dois antifúngicos, incorporados em nanoemulsões carregadas negativamente e positivamente (com lecitina de ovo 2% mais ácido deoxicólico 0,5% e lecitina de ovo 2% mais estearilamina 0,5%, respectivamente como sistema tensoativo e 10% de TCM na fase oleosa). Células de difusão de Franz foram utilizadas contendo tampão fosfato pH 7,4 volume de 6,5ml como meio receptor, mantido sob agitação com agitador magnético e 37°C de temperatura do meio. Para este estudo foi utilizada pele de rato. Aproximadamente 10mg da formulação foi colocada no compartimento doador. O experimento durou 26h e as coletas foram realizadas e analisadas por radioatividade e CLAE. Os resultados demonstraram que as nanoemulsões carregadas positivamente mostraram-se mais eficientes em termos de permeação em relação às carregadas negativamente, para ambas as moléculas, demonstrando que estas formulações são capazes de promover a penetração e, conseqüentemente, a permeação através da pele. Os pesquisadores atribuíram este fato à carga negativa apresentada pela pele em pH neutro, o que resulta em uma maior interação desta com a formulação carregada positivamente.

Fang e colaboradores (2004) investigaram o efeito de nanoemulsões lipídicas na liberação tópica *in vitro* do flurbiprofeno, um anti-inflamatório não esteróide (AINE), incorporado em nanoemulsão carregada tanto negativamente como positivamente, utilizando células de difusão. O fluido receptor foi tampão citrato-fosfato pH 7,4 mantido sob agitação com agitador magnético a 600rpm e sob temperatura de 37°C. Após 24h de experimento a pele também passou por processo de homogeneização. As amostras foram analisadas em CLAE. Ao contrário do resultado obtido por PIEMI e colaboradores (1999), a presença do tensoativo catiônico estearilamina resultou em uma redução do fluxo de permeação deste em comparação com as formulações carregadas negativamente, sendo que foi observado que apesar da adição de estearilamina, o potencial zeta desta formulação continuou negativo (cerca de -19,5 mV). Além disso, a viscosidade apresentada por esta formulação foi duas a três vezes superior em comparação com as formulações carregadas negativamente. A formação

do gel resultante da cristalização e solidificação deste tensoativo na fase oleosa foi atribuída como uma das possíveis causas deste aumento da viscosidade, o que contribuiu para o baixo fluxo de permeação apresentado por esta formulação.

Alves e colaboradores (2007) avaliaram a permeação cutânea do anti-inflamatório nimesulida, que foi incorporada em três diferentes formulações, nanoemulsão lipídica, nanoesferas e nanocápsulas, associadas em hidrogéis de carbopol. Para o estudo de permeação com células de difusão de Franz foi utilizado pele humana e como meio receptor, tampão fosfato pH 7,4 contendo 10% de polietilenoglicol 400. Uma dose de 1g de gel foi utilizada para os experimentos sendo colocados sobre a pele. Em intervalos de tempos determinados, alíquotas de 500µg foram coletadas. A temperatura do meio foi mantido em 37°C sob agitação com agitador magnético. Após 24h de experimento foi realizado a técnica de tape stripping. Os resultados mostraram que a nimesulida encapsulada na nanoemulsão e, posteriormente veiculada no gel, não foi detectada no estrato córneo, uma vez que o fármaco permeou diretamente para a derme. As outras formulações apresentaram retenção no estrato córneo sugerindo afinidade dos polímeros por esta camada.

Moléculas utilizadas na terapia fotodinâmica também são avaliadas através da sua incorporação em nanoemulsões. Estudos inovadores envolvendo nanoemulsões magnéticas têm sido recentemente descritas na literatura e são realizados através da utilização de fluidos magnéticos biocompatíveis (LAÇAVA et al., 2002; MACAROFF et al., 2005). Fluidos magnéticos consistem em nanopartículas magnéticas dispersas como colóides estáveis em fluidos orgânicos ou inorgânicos. No caso de fluidos magnéticos biocompatíveis, estes devem ser estáveis em meio fisiológico. Este material normalmente é desenvolvido com o intuito de induzir uma hipertermia local em tecidos biológicos quando expostos a um campo magnético (GUEDES et al., 2005), sendo esta atividade considerada para o tratamento de pacientes com câncer. Neste sentido, a terapia fotodinâmica foi estabelecida como uma alternativa bem sucedida no tratamento antitumoral com mínimos efeitos colaterais. Esta se baseia na administração de um marcador tumoral fotossensibilizante seguida da exposição do

tumor a luz visível entre 600 e 800nm, conhecida como janela terapêutica (TEDESCO et al., 2003) , na qual o marcador absorve radiação, excita-se interagindo com as macromoléculas biológicas vizinhas conduzindo a destruição irreversível dos tecidos alvo (LUNARDI et al., 1999). Primo e colaboradores (2006) avaliaram o perfil de liberação *in vitro* do foscan®, um marcador tumoral sensibilizante, incorporado em nanoemulsão comum e nanoemulsão magnética. Neste estudo foram utilizadas células de difusão de Franz e tampão fosfato pH 7,4, contendo etanol 20%. Os resultados mostraram que ocorreu um aumento na permeação do foscan® através da pele quando associado à nanoemulsão magnética em relação à nanoemulsão comum.

Primo e colaboradores (2008) também desenvolveram nanoemulsões magnéticas contendo ftalocianina de zinco (ZNPC), um marcador tumoral fotossensibilizante. Estudos de difusão em células de Franz foram realizados para avaliar a retenção cutânea, logo, foi utilizado pele de orelhas de suíno, tampão fosfato mais etanol 20% (v/v) como fluido receptor (7ml) e 200ml de amostra aplicadas sobre a pele. O experimento foi realizado a 37°C e após 12h de difusão foi realizado o ensaio de tape stripping e a homogeneização de tecidos (com o restante da pele). Estas duas amostras obtidas foram analisadas por curva padrão de fluorescência. Os resultados demonstraram que a acumulação na pele do ativo é maior com a nanoemulsão magnética do que com apenas nanoemulsão de ZNPC e que a retenção no estrato córneo foi cerca de 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e nas camadas mais profundas foi cerca de 55 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ tornando possível sua aplicação tópica na pele.

Na área de cosméticos, moléculas com atividade fotoprotetora, antioxidante, entre outras, também tem sido encapsuladas em sistemas de liberação como as nanoemulsões e sua retenção na pele também pode ser avaliada através de técnicas de difusão em células tipo Franz. Assim, Fernandez e colaboradores (2000) avaliaram a permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de três formulações, sendo duas emulsões convencionais e uma nanoemulsão lipídica constituída de óleo de coco e TCM na fase oleosa e estearato de sorbitano, monooleato de sorbitano e ou sepigel como estabilizadores. Nesse estudo utilizou-se pele de orelha suína e solução salina

fisiológica como meio receptor. Os resultados demonstraram que a nanoemulsão aumentou mais de três vezes a concentração de benzofenona-3 na pele após 8h de experimento, em comparação com as outras formulações.

Teeranachaideekul e colaboradores (2007) realizaram esta técnica para nanoemulsão contendo 3,4% de coenzima Q10, 7,6% de Mygliol[®] como núcleo oleoso e 1,8% de Tego[®] care 450 como tensoativo. O volume da fase receptora foi de 6,0ml e em solução aquosa com 5% de Labrasol[®] pH 5 agitado por barra magnética (700rpm). Amostras de 100µL da nanoemulsão foram colocadas no compartimento doador sobre a membrana. Amostras de 500µL foram coletadas em tempos pré-estabelecidos por 24h e analisadas por CLAE. Os resultados indicaram uma liberação de aproximadamente 550 µg/cm² de coenzima Q10 da nanoemulsão, valor este relativamente maior do que para outras formulações testadas por este mesmo grupo contendo carreadores lipídicos nanoestruturados.

Ainda em relação a estudos de liberação in vitro utilizando-se células de difusão de Franz, Ruktanonchai e colaboradores (2009) realizaram estudo de permeação in vitro do ácido alfa lipóico (1%), um antioxidante, incorporado em nanoemulsão contendo 9% de Migliol[®] como núcleo oleoso e 2,5% de Pluronic[®] F68 como tensoativo. Para avaliar a quantidade de ácido alfa lipóico liberado da formulação foi utilizado como fluido receptor uma solução aquosa de tampão fosfato pH 5,5 e 20% de etanol. Amostras de 1g da formulação foram colocadas sobre uma membrana de ultrafiltração. Alíquotas de 0,5ml foram coletadas em tempos pré-estabelecidos. As amostras coletadas foram analisadas por CLAE. Os resultados mostraram que em até 72h foi liberado 62% de ácido alfa lipóico da nanoemulsão, conteúdo duas a três vezes superior do que quando comparado com outras formulações testadas por este mesmo grupo (nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados).

Silva e colaboradores (2009) desenvolveram nanoemulsões contendo 0,1% de genisteína incorporada em 8% de TCM ou ODD e 2% de lecitina de ovo como tensoativo. A permeabilidade percutânea das nanoemulsões foi avaliada utilizando

células de difusão de Franz. Solução metanólica (50% v/v) foi utilizada como fluido receptor. A solução de acetona (reservatório volátil) e a nanoemulsão testadas, ambas com uma concentração de 1mg de genisteína foram colocadas no compartimento doador. O experimento foi mantido em temperatura de 37°C por 8h. Aliquotas de 2,0ml foram coletadas em tempos pré-determinados e analisadas por CLAE. Após 8 h, a quantidade total de genisteína permeada a partir do reservatório volátil foi de aproximadamente 60 mg/cm² com um fluxo de 13 mg/cm²/h e independente do núcleo oleoso testado a permeação na pele da genisteína a partir de nanoemulsão foi mais lenta do que a partir da acetona (permeabilidade intrínseca). A incorporação de genisteína em nanoemulsões parece reduzir o valor de fluxo da mesma na pele, isto que pode ser atribuído as interações entre a genisteína e o fosfolípido da lecitina de ovo da formulação. Os resultados também mostraram que a permeação através da pele da genisteína incorporada em ODD foi maior que a incorporada em TCM (21mg/cm² e 15mg/cm², respectivamente), de fato o valor de fluxo foi 1,4 vezes maior para a nanoemulsão com ODD.

Fasolo e colaboradores (2009) desenvolveram nanoemulsões contendo outros flavonóides, quercetina (Q) e 3-O-metilquercetina (MQ), compostas de ODD como fase oleosa e lecitina de ovo como tensoativo além da inclusão de CTAB como tensoativo juntamente com a lecitina para as nanoemulsões carregadas positivamente, e então avaliaram o perfil de permeação destas moléculas na pele através da utilização de células de Franz. Para este ensaio utilizou-se pele de orelha de suína e solução hidroetanólica (50%, v/v) como fase acceptora. As amostras de nanoemulsão foram colocadas no compartimento doador e continham uma concentração teórica dos flavonóides de 1,0mg. O fluido receptor foi mantido a 37°C e sob agitação durante o experimento (8h), e as amostras foram coletadas em tempos pré-determinados e analisadas por CLAE. Os resultados indicaram que, independente da formulação a permeação da Q e MQ foi reduzida, e estas moléculas acumularam-se na pele, e que a permeação dos flavonóides a partir de nanoemulsão carregada positivamente apresentou um aumento significativo em relação a nanoemulsão carregada negativamente.

Referências

- AFAQ, F. and MUKHTAR, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Experimental Dermatology*, v. 15, p. 678-684, 2006.
- ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L. ; SANTOS, M. ; POHLMANN, GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 341, p. 215-220, 2007.
- ALVES, M. P., POHLMANN, A. R. e GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. *Pharmazie*, v. 60, p. 900-904, 2005.
- ARORA, A.; BYREM, T.M.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Modulation of Liposomal Membrane Fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 373, p.102-109, 2000.
- ANTON, N.; BENOIT J-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. *Journal of Controlled Release*, v. 128, p. 185-199.
- BENITA, S. Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 53, p. 193-206.
- BENITA, S. *Submicron Emulsion in Drug Targeting and Delivery*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.
- BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 280, p. 241-251.
- BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 541-555.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Câncer de Pele. Disponível in: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=333. Acess: 21/12/2009.
- BRONAUGH, R. L., MAIBACH, H. I. Measuring Penetration Rates *in vitro*. In: Collier, S. W., Bronaugh R. L. (Eds.), *In vitro percutaneous absorption*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p. 37-39, 1995.
- CHUNG, H.; KIM, T. W.; KWON, M.; KWON, I. C.; JEONG, S.Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsion as drug or gene delivery system. *Journal of Controlled Release*, v. 71, p. 339-350, 2001.
- COOKE, P.S. et al. Genistein, Estrogen Receptors, and the Acquire Imunne Response. *The Journal of Nutrition*, v.136, p.704-708, 2006.
- DUNCAN, J. I., PAYNE, S. N. L., WINFIELD, A. J., ORMEROD, A. D., THOMSON, A. W. Enhanced percutaneous absorption of a novel topical cyclosporin A formulation and assessment of its immunosuppressive activity. *British Journal of Dermatology*, v. 123, p. 631-640, 1990.
- EZRA, R.; BENITA, S.; GINSBURG, I.; KOHEN, R. Prevention of oxidative damage in fibroblast cell cultures and rat skin by positively-charged submicron emulsion of α -tocopherol. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 42, p. 291-298, 1996.

F'GUYER, S., AFAQ, F., MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, v. 19, p. 56-72, 2003.

FANG, J-Y.; LEU, Y-L; CHANG, C-C. Lipid nano/submicron emulsions as vehicles for topical flurbiprofen delivery. *Drug Delivery*, v.11, p. 97-105, 2004.

FASOLO, D.; LIEGE, S.; HOLZSCHUH, M.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, n. 44, p. 1174-1177, 2007.

FASOLO, D., BASSANI, V. L., TEIXEIRA, H. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. *Pharmazie*, n. 64, p. 726-730, 2009.

FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; RAMOS, J.; MAILLOLS, H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of in vitro and in vivo skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 155-165, 2000.

FRIEDMAN, D.I.; SCHWARZ, J.S.; WEISSPAPIR, M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.84, p.324-329, 1995.

FRONZA, T., CAMPOS, A., TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, n. 4, p. 558-556, 2004.

GODIN B, TOUITOU E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 1152-1161, 2007.

GUEDES, M. H. A.; SADEGHIANI, N.; PEIXOTO, D. L. G.; COELHO, J. P.; BARBOSA, L. S.; AZEVEDO, R. B.; KÜCKELHAUS, S.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M. Effects of AC magnetic field and carboxymethyl dextran-coated magnetite nanoparticles on mice peritoneal cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 293, p. 283-286, 2005.

HADGRAFT, J. and LANE, M.E. Skin permeation: the years of enlightenment. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 305, p. 2-12, 2005.

HATZIANTONIOU, S., DELI, G., NIKAS, Y., DEMETZOS, C. e PAPAIOANNOU G. Scanning electron microscopy study on nanoemulsions and solid lipid nanoparticles containing high amounts of ceramides. *Microscopy in Nanobiotechnology*, v. 38, p. 819-823, 2007.

HUANG, Z-R., HUNG, C-F., LIN Y-K., FANG J-Y. *In vitro* and *in vivo* evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 19, p. 36-44, 2008.

JARACZ, S., CHEN, J., KUZNETSOVA, L. V., OJIMA, I. Recent Advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 5043-5054, 2005.

JUMMA, M.; MULLER, B.W. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability of parenteral fat emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 163, p. 81-89, 1998.

JUNYAPRASERT, V. B., TEERANACHAIDEEKUL, V., SOUTO, E. B., BOONME, P. e MÜLLER, R. H. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 377, p. 207-214, 2009.

- KATIYAR, S. K. UV-induced immune suppression and photocarcinogenesis: Chemoprevention by dietary botanical agents. *Cancer Letters*, v. 255, p. 1-11, 2007.
- KATIYAR, S., ELMETS, C.A., KATIYAR, S. K. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 18, p. 287-296, 2006.
- KENTISH, S.; WOOSTER, T.J.; ASHOKKUMAR, M.; BALACHANDRAN, S.; MAWSON, R.; SIMONS, L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 9, p. 170-175, 2008.
- KIBBE, A. H. (Ed.). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.
- LACAVAL, L. M.; LACAVAL, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; CHAVES, S. B.; GARCIA, V. A. P.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 252, p. 367-369, 2002.
- LI, L.C. and TIAN, Y. Zeta potencial. In: James, S.; JAMES, C.B. (Ed.). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002.
- LIN, J. Y. Topical Isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, v. 24, p. 61-66, 2008.
- LUNARDI, C. N.; BONILHA, B. S.; TEDESCO, A. C. Stern-Volmer quenching and binding constants of 10-alkyl-9(10H)-acridone probes in SDS and BSA. *Journal of Luminescence*, v. 99, p. 61-71, 2002.
- MACAROFF, P. P.; OLIVEIRA, D. M.; LACAVAL, Z. G. M.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Investigation of pheophorbide/magnetic fluid complex as a promising system for early cancer detection and treatment. *Journal of Applied Physics*, v. 97, p. 10Q906-10Q906-3, 2005.
- MARROT, L., BELAÏDE, J.P., JONES, C., PEREZ, P., MEUNIER, J. R., Molecular responses to stress induced in normal human caucasian melanocytes in culture by exposure to simulated solar UV. *Photochemistry and Photobiology*, v. 81, p. 367-375, 2005.
- MIYAZAKI, K. Genistein and Dadzein Stimulate Hialuronic Acid Production in Transformed Karatynocyte Culture and Hairless Mouse Skin. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, v. 15, p. 175-183, 2002.
- MUCHTAR, S.; BENITA, S. Emulsions as drug carriers for ophtalmic use. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 91, p. 181-190. 1994.
- NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. *Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas*. Porto Alegre: ARTMED, 2002. 299p.
- PIEMI, M.P.Y.; KORNER, D.; BENITA, S.; MARTY, J-P. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. *Journal of Controlled Release*, v. 58, p.177-187, 1999.
- PINNEL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol*, v. 48, p. 1-19, 2003.
- PRIMO, F. L.; MICHIELETO, L.; RODRIGUES, M. A. M.; MACAROFF, P. P.; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan®: Skin permeation and retention in vitro

assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 311, p.354-357, 2006.

PRIMO, F. L., RODRIGUES, M. M. A., SIMIONI, A. R., BENTLEY, M. V. L. B., MORAIS, P. C. e TEDESCO, A. C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 320, p. e211–e214, 2008.

RABINOVICH-GUILATT, L.; DUBERNET, C.; GAUDIN, K. LAMBERT, G.; COUVREUR, P.; CHAMINADE, P. Phospholipids hydrolysis in a pharmaceutical emulsion assessed by physicochemical parameters and a new analytical method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 61, p. 69-76, 2005.

ROTHWELL, J. A., DAY, A. J., MORGAN, M. R. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 4355–4360, 2005.

RUKTANONCHAI, U., BEJRAPHA, P., SAKULKHU, U., OPANASOPIT, P., BUNYAPRAPHATSARA, N., JUNYAPRASERT, V. e PUTTIPIPATKHACHORN, S. Physicochemical Characteristics, Cytotoxicity, and Antioxidant Activity of Three Lipid Nanoparticulate Formulations of Alpha-lipoic Acid. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, p. 227-234, 2009.

SAIJA, A., SCALESE, M., LANZA, M., MARZULLO, D., BONINA, F., CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 19, p. 481-486, 1995.

SAKULKU, U., NUCHUCHUA, O., UAWONGYART, N., PUTTIPIPATKHACHORN, S., SOOTTITANTAWAT, A. e RUKTANONCHAIU. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 372, p. 105-111, 2009.

SCHMID, M. H; KORTING, H. C. Liposomes for atopic dry skin: the rationale for a promising approach. *Clinical Investigation*, v. 71, p. 649-653, 1993.

SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. R.; FRIEDMAN, D. I. Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 5, p. 687-692, 1995.

SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. R.; SHANI, A.; AMSELEM, S. Enhanced antiinflammatory activity of diclofenac in jojoba oil submicron emulsion cream. *Journal of Applied Cosmetology*, v. 14, p. 19-24, 1996.

SHAH, V. P. Skin penetration enhancers: scientific perspectives. In: HSIEH, D. S. *Drug Permeation Enhancement: theory and applications*. New York: Marcel Dekker, cap. 2, 1994.

SILVA, A. P. C, KOESTER, L. S., MAYORGA, P., BASSANI, V. L., TEIXEIRA, H. Development and validation of a LC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. *Pharmazie*, v. 62, p. 732-734, 2007.

SILVA, A.P.C.; NUNES, B.R.; OLIVEIRA, M.C.; KOESTER, L.S.; MAYORGA, P.; BASSANI, L. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. *Pharmazie*, v. 64, p. 32-35, 2009.

SILVA, C. A. DA; MARTINI, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, H.F. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 25, p. 17-21, 2006.

- SILVANDER, M.; HELLSTROM, A.; WARNHEIM, T.; CLAESSION, P. Rheological properties of phospholipid-stabilized parenteral oil-in-water emulsions-effects of electrolyte concentration and presence of heparin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 252, p. 123-132, 2003.
- Tagne JB, Kakumanu S, Nicolosi RJ. A Nano-emulsion Formulation of Tamoxifen Increases Its Efficacy in a Breast Cell Line. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, p.1055-1063, 2008.
- TEDESCO, A. C.; LUNARDI, C. N.; ROTTA, J. C. G. Zinc tetranitrophthalocyanine: isomer separation and photophysical photobiological evaluation in J774A tumor cells. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 7, p. 493, 2003.
- TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Physicochemical characterization and in vitro release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). *Journal of Microencapsulation*. v. 25, n. 2, p. 111-120, 2008.
- TEIXEIRA, H.; MARTINI, E.; SILVEIRA, A. M.; DUBERNET, C. Preparação e caracterização de nanoemulsões contendo oligonucleotídeos antisense através de técnica de emulsificação espontânea. *Caderno de Farmácia*, v. 18, n. 2, p. 89-93, 2002.
- TRAUL, K. A.; DRIEDGER, A.; INGLE, D. L.; NAKHASI, D. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food and Chemical Toxicology*, v. 38, p.79-98, 2000.
- ULLRICH, S.E. Mechanisms underlying UV-induced immune suppression. *Mutation Research*, v. 571, p. 185-205, 2005
- VAYALIL, P.K., ELMETS, C.A., KATIYAR, S.K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis*, v. 24, p. 927-936, 2003.
- WEI, H., BOWEN, R., CAI, Q., BARNES, S., WANG, Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proceedings of Social Experimental Biology and Medicine*, v. 208, p. 124-130, 1995.
- WEI, H.; ZHANG, X.; WANG, Y.; LEBWOHL, M. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Letters*, v. 185, p.21-29, 2002.
- WEI, H.; SALADI, R.; LU, YUHUN; WANG, Y.; PALEP, S.R.; MOORE, J.; PHELPS, R.; SHYONG, E.; LEBWOHL, M.G. Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. *Journal of Nutrition*, v. 133, p. 3811S-3819S, 2003.
- WIDYARINI, S. Estrogen receptor signaling protects against immune suppression by UV radiation exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 34, p. 12837-12842, 2006.
- YANG, S-C., BENITA, S. Enhanced absorption and drug targeting by positively charged submicron emulsions. *Drug Develivory Researche*, v. 50, p. 476-486, 2000.
- YILMAZ, E. and BORCHERT, H-H. Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 60, p. 91-98, 2005.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema – An in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 307, p. 232-238, 2006.

ZEEVI, A.; KLANG, S.; ALARD, V.; BROSSARD, F.; BENITA, S. The design and characterization of a positively charged submicron emulsion containing a sunscreen agent. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 108, p. 57-68, 19

CAPÍTULO II

Hidrogéis de uso tópico contendo nanoemulsões de genisteína.
Desenvolvimento e validação de um método por cromatografia líquida para a
determinação do perfil de retenção da genisteína na pele

Neste primeiro capítulo experimental tivemos por objetivo o desenvolvimento e validação de um método por cromatografia líquida isocrática para quantificar a genisteína nas diferentes camadas de pele de orelha suína a partir de nanoemulsões, antes e após a sua dispersão em hidrogéis. Depois de testadas diversas condições cromatográficas, as análises foram realizadas a temperatura ambiente em uma coluna de fase reversa C18 utilizando uma fase móvel composta de metanol água (70:30, v/v) em meio ácido (pH 3,0) e detecção ultravioleta a 270 nm. O método foi linear em um intervalo de concentração compreendido entre 0,1 e 10 µg/mL ($r > 0,999$) tanto no fluido receptor (Tampão fosfato/Etanol, 70:30) como em soluções em presença de extratos de diferentes camadas da pele (i.e. stratum corneum, epiderme e derme). O limite de quantificação inferior foi estimado em 0,1 µg/mL. Não foram detectadas interferências dos adjuvantes das formulações e das camadas da pele. Os desvios-padrão relativos nos estudos de precisão intra-dia e inter-dia apresentaram valores inferiores a 15%, enquanto que a recuperação foi entre 90 e 110%, de acordo com as especificações dos códigos oficiais. O método foi testado para a determinação da genisteína a partir das formulações nas diferentes camadas da pele após 8 horas de permeação utilizando células de difusão de Franz. A maior concentração de genisteína ($185 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) foi detectada na epiderme a partir dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de genisteína. Em conclusão, esta primeira etapa do trabalho descreve um método específico, linear, preciso e exato para determinar a genisteína no fluido receptor, estrato córneo, epiderme e derme em estudos de permeação da pele com as diferentes formulações testadas.

Topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions: development and validation of an LC method to determine skin retention profile of genistein

Bethânia Andrade de Vargas, Débora Fretes Argenta, Leticia Scherer Koester, Valquiria Linck Bassani, and Helder Ferreira Teixeira*

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed:

helder.teixeira@ufrgs.br

Keywords: genistein, nanoemulsions, skin retention, validation

Abstract

This article describes the validation of an isocratic liquid chromatographic method to determine genistein (GEN) in porcine ear skin layers from nanoemulsions incorporated in hydrogels. The analyses were performed at room temperature on a reversed-phase C18 column using a mobile phase composed of methanol/water (70:30, v/v) under acid conditions (at pH 3.0) and UV detection at 270nm. The method was linear in the range of 0.1-10 μ g/mL ($r > 0.999$) in the presence of skin layer extracts. The low limit of quantification was estimated as 0.1 μ g/mL. No interferences from nanoemulsion excipients or skin layer compounds were detected. The R.S.D. values for intra- and inter-day precision were lower than 15%. Recovery ranged from approximately 90 to 110%. The method was finally applied to estimate GEN retention in the skin from formulations using Franz diffusion cells. The highest amount of GEN was detected in the epidermis (185 μ g/cm²). In conclusion, the method proved to be specific, precise and accurate in determining GEN amounts from formulations in skin retention studies.

Introduction

Genistein (GEN) is a phytoestrogen which belongs to the isoflavone class of flavonoids, naturally occurring in soybean seeds. The effect of GEN on the protection of skin photoaging and carcinogenesis has been extensively investigated (MESSINA et al., 1994; AFAQ and MUKHTAR, 2006; MOORE et al., 2006; LIN et al., 2008; DINKOVA-KOSTOVA, 2008). Wei and co-workers (2003) have reviewed the skin effect of topically administered GEN. The main action mechanism involves protection of oxidative and photodynamically damaged DNA, down-regulation of ultraviolet-B activated signal transduction cascades, and antioxidant activities.

Recently, nanoemulsions have been considered as potential topical delivery systems for GEN due to the poor water solubility. GEN can be efficiently incorporated into the oil core of nanoemulsions (SILVA et al., 2007). Previous studies have described the permeation profile of GEN from nanoemulsions composed of a medium chain triglyceride or octyldodecanol oil core stabilized by egg-lecithin, assessed in porcine ear skin using Franz diffusion cells (SILVA et al., 2009). The overall results showed a slow permeation profile of GEN from both formulations, compared to the volatile reservoir, suggesting the affinity of this isoflavone for oil core of nanoemulsions.

However, GEN skin retention has not yet been assessed from these nanoemulsions. Even though recent literature describes the use of liquid chromatography (LC) methods to assay GEN (isolated or in mixture with other isoflavones) in permeation studies (MINGHETTI et al., 2006; HUANG et al., 2008; GEORGETTI et al., 2008), a literature survey reveals the absence of validated methods for estimating GEN in skin layer samples. The validation of sensitive analytical methods is a key issue in skin penetration studies, especially when UV detection is used, due to the possible interference of UV absorbing compounds in skin samples and formulation excipients (FDA, 2001; ICH, 2005). This article describes the development and validation of an LC method to assay GEN in porcine ear skin layers using Franz diffusion cells from nanoemulsions before and after their incorporation into hydrogels.

Experimental

Chemical and reagents

Egg-lecithin and medium chain triglycerides (MCT) were kindly donated by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Carbomer 940 and thrietanolamine were obtained from Delaware (Porto Alegre, Brazil). GEN (>98% purity) was purchased from Sigma (São Paulo, Brazil). Methanol LC grade and phosphoric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Preparation and characterization of nanoemulsions

Nanoemulsions composed of MCT, egg-lecithin, water and GEN (at 1mg/mL) were obtained by means of spontaneous emulsification procedure. The formulation was incorporated in a carbomer-hydrogel at a final concentration of 0.5% of the polymer. The physicochemical properties of the formulations were presented in a separate article (VARGAS et al., 2010).

Chromatographic conditions and apparatus

The LC apparatus consisted of a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with a model LC-20AT pump, a SPD-20AV UV-VIS variable wavelength detector (set at 270 nm), a degasser DGU-20A5, a CBM-20A system controller, and SIL-20A injection valve with a 100 μ L loop. GEN was analyzed using a Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18 column (5 mm, 250 mm \times 4 mm i.d.). Several proportions of acetonitrile and/or methanol and water mixtures, in the presence or not of increasing amounts of phosphoric acid (up to pH 2.5), were evaluated as a suitable mobile phase for the assay of GEN. The selected phase consisted of a methanol:water mixture (70:30 w/w) at pH 3.0 in isocratic flow. The LC system was operated at a flow rate of 1.2 mL/min, and the sensitivity was 0.5 AUFS, at room temperature. All calculations were performed with external standardization by measurement of peak areas. For evaluation of the peak purity, a Waters 2690 Separation Module with autosampler, software Empower, coupled to a Waters 996 Photodiode array-UV Scanning Detector was employed.

Calibration curves

A stock solution of GEN was prepared by dissolving 5mg of GEN in 50mL of methanol in order to obtain a final concentration of 100µg/mL. This solution was then diluted to obtain different series of standard solutions. The stock solution was further diluted to obtain seven concentrations (0.1 to 10.0 µg/mL) with appropriate volumes of receptor fluid and stratum corneum, epidermis, and dermis methanol solutions.

GEN extraction

To optimize the GEN extraction, stratum corneum, epidermis, and dermis samples were spiked with a methanol solution of GEN. After 1h, to allow GEN penetration and solvent evaporation, increasing amounts of methanol (2, 3, 5, or 10 mL) were used to extract GEN from samples, leading to the final theoretical GEN concentration of 12.5, 8.33, 5, and 2.5 µg/mL. The samples were shaken and maintained in an ultrasound bath for 30min. Samples were then filtered through a 0.45µm pore size membrane filter, and the GEN content was assayed by LC.

Method validation

The LC method to determine GEN in both the fluid receptor and skin layers, based on recommendations from ICH for bioanalytical assays (ICH, 2005), was then validated as follows: (i) The specificity of the method was performed by analyzing skin samples or tapes used in tape stripping experiments in the presence of GEN methanol solutions or blank formulations. The system response was examined through the presence of interference or overlaps with GEN response. (ii) For linearity experiments, GEN solutions (in the presence of skin layer extracts) were prepared at seven concentrations within the range of 0.1–10 µg/mL, on three different days. The linearity was determined by plotting the detector response versus the nominal GEN concentration, which allowed for the evaluation of the calibration curve and coefficient of determination. (iii) The low limit of quantification (LLOQ) was determined by assaying five independent samples of standards and determining the relative standard deviation. LLOQ was the lowest concentration of GEN which can be determined with precision and accuracy. (iv) The intra-day precision (repeatability) of the method was

determined by analyzing four samples of GEN at four levels (0.1, 1, 5, and 10 µg/mL) in the presence of skin layer extracts, during the same day under the same experimental conditions. Inter-day precision values were obtained by assaying GEN samples of the same concentrations levels on three different days. The results were expressed as relative standard deviation (R.S.D.). (v) Accuracy was evaluated as the standardized correlation between the measured value and the theoretical value, as follows: RE% = [mean calculated concentration – theoretical value]/theoretical value) (CAUSON, 1997). (vi) Recovery was determined comparing the response of GEN extracted from the skin with the response of GEN solutions not submitted to extraction, expressed as a percentage. The samples were analyzed at 0.1, 1, 5, and 10 µg/mL. (vii) The stability of GEN-spiked skin extracts was determined after 15 days storage at 4°C. Three replicates from SC-containing adhesive tapes and skin layers were spiked with GEN. After, GEN was extracted and assayed by LC.

GEN permeation/retention in porcine ear skin from formulations

GEN permeation was assessed using Franz type diffusion cells which presented a surface area for diffusion of 1.77 cm² and a receptor volume of 10.0 ml. Excised circular pig ear skin was set between the donor and the receptor compartments, with the inner part facing the upper inside portion of the cell. Experiments were performed in sink conditions due to the presence of 30% ethanol in PBS pH 7,4 as receptor phase. The bathing solution was kept under a controlled temperature (37 ± 1.0°C) and stirred. About 500µl of GEN-loaded nanoemulsions (containing GEN at 1mg/mL) were placed in the donor compartment, before and after their incorporation in hydrogels. At the end of the experiment (8h), samples of 1.0 ml were withdrawn and the skin was removed from the cell and cleaned using a cotton swab. The first stripped tape was discarded, while the following 15 tapes were used for GEN assay. Next, the epidermis was separated from the dermis by submerging skin slices in water heated to 60°C for 45 seconds, using a scalpel. The dermis was perforated into tiny pieces and the layers were weighed and placed in the test tube. Results are expressed as mean±standard deviation of GEN retained per unit of area (µg/cm²) of three independent experiments and were analyzed by the Student t-test with p < 0.05 significance.

Results and Discussion

Method development and validation

This study aimed to describe an LC method to determine the GEN retention profile in porcine ear skin layers from GEN-loaded nanoemulsions, before and after their incorporation in carbomer-hydrogels (VARGAS et al., 2010). In a preliminary set of experiments, different proportions of acetonitrile and/or methanol and water have been tested as a suitable mobile phase for GEN assay. However, in most cases, the base peak was broad with a low purity peak. Increasing amounts of phosphoric acid were added to the mobile phase in order to avoid peak tailing and to reduce retention time. These results allowed us to optimize a suitable isocratic reversed phase LC method using methanol/water 70:30 (v/v) at pH 3.0 as a mobile phase. The retention time of GEN was approximately 4.0 min as can be seen in figure 1A. In such acid conditions, a satisfactory peak resolution and symmetry could be observed, most likely due to a favoring of a non-ionized form of GEN (IBERN-GOMEZ et al., 2003).

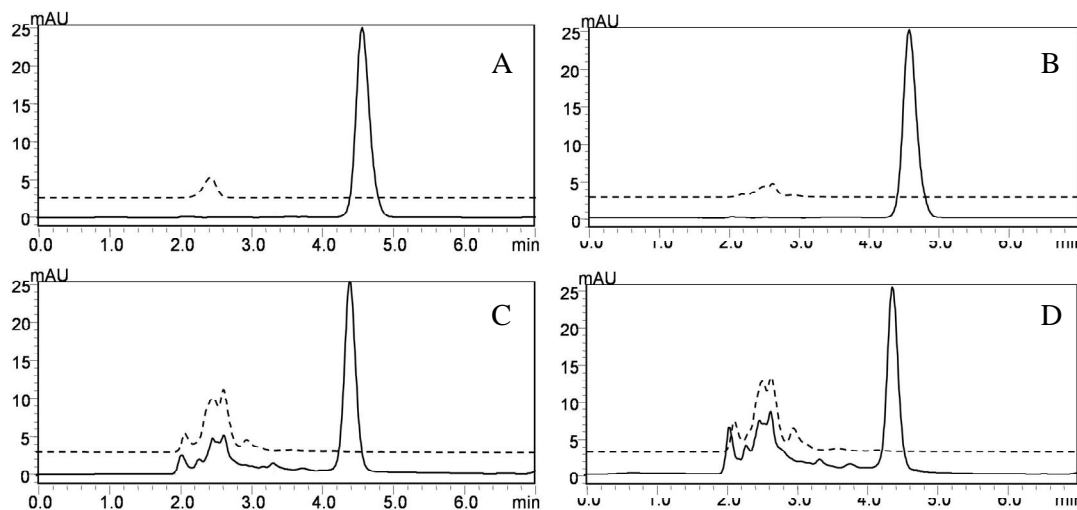


Figure 1. Representative chromatograms of specificity study. (A) Receptor fluid and GEN methanol solution. (B) Stratum corneum (C) Epidermis and (D) dermis-spiked with GEN-loaded nanoemulsion hydrogels. Dashed lines: non-spiked samples; Solid lines: Samples spiked with GEN-loaded nanoemulsion hydrogels.

The specificity was assessed through the comparison of the GEN peak retention time in the presence of nanoemulsion components and skin layer extracts. Figure 1 exhibits typical chromatograms of a GEN methanol solution (1A) and GEN-loaded formulation components in the presence of porcine skin layers (1B-1D). The chromatograms showed that the method is specific since no interference of formulation and skin components (skin layers and tapes used for the tape stripping) could be observed and since no peak was detected in the GEN retention time at set wavelengths.

The linearity of the method was evaluated in the presence of both fluid receptor and skin layer extracts (Table 1). The linearity experiments were carried out in different media (i.e. receptor fluid, stripped skin, epidermis, and dermis). Satisfactory linearity could be observed in the evaluated concentration ranges. The response for the drug was linear and the calibration equations showed excellent determination coefficients ($r^2 > 0.999$), which were highly significant for the method ($P < 0.05$). The confidence intervals for the intercept included zero in all cases, confirming the absence of a constant systematic error. The lowest concentration of the calibration curve was used as the limit of quantification since analyte peak was reproducible with a precision of 20% and accuracy of 80-100%, according to FDA recommendations for bioanalytical method validation (FDA, 2001). In this study LLOQ was set as 0.1 $\mu\text{g/mL}$, indicating a satisfactory sensitivity of the proposed method for retention studies.

Table 1. Linearity data of LC assay for GEN.

| Parameter | Equation | <i>R</i> | Intercept |
|----------------|--------------------------|----------|--------------------|
| Receptor Fluid | $y = 97374x - 2576.4$ | 0.9993 | [-1978.07;7130.94] |
| Stripped Skin | $y = 109111.9x + 1805.3$ | 0.9993 | [-8893,48;5282.92] |
| Epidermis | $y = 117426.9x + 1050.6$ | 0.9991 | [-8305.39;6203.97] |
| Dermis | $y = 113388.0x + 1693.1$ | 0.9995 | [-2962.32;5232,32] |

GEN at 0.1 to 10.0 $\mu\text{g/mL}$.

Table 2 shows the effect of increasing amounts of methanol on GEN extraction from skin samples. Methanol was chosen because GEN is freely soluble in this solvent (MINGHETTI et al., 2006). As can be seen, a progressive GEN extraction was observed with the progressive addition of methanol until reaching a plateau. Regardless of the sample, it was necessary to add at least 5mL methanol to extract more than 95% of GEN from the samples. Such GEN extraction conditions were used in subsequent studies, since this involves only few steps and a satisfactory time period. In addition, the GEN recovery after storage remained quite similar, indicating that the freezing process affected neither GEN stability nor the efficiency of the procedure.

Table 2. GEN recovery using different amounts of methanol.

| Methanol (mL) | GEN ($\mu\text{g/mL}$) | Recovery (%) | | |
|---------------|--------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | | Stratum corneum | Epidermis | Dermis |
| 2 | 12.5 | 88.9 \pm 3.2 | 55.4 \pm 8.5 | 69.0 \pm 5.6 |
| 3 | 8.33 | 102.3 \pm 5.7 | 70.1 \pm 9.6 | 93.8 \pm 11.9 |
| 5 | 5.00 | 100.1 \pm 2.6 | 96.7 \pm 4.7 | 95.6 \pm 3.8 |
| 10 | 2.50 | 102.1 \pm 8.3 | 96.5 \pm 5.1 | 95.3 \pm 7.2 |

The precision of the method was assessed considering repeatability and intermediate precision at three concentration levels (1.0, 5.0, and 10.0) as well as at the LLOQ (estimated as 0.1 $\mu\text{g/mL}$) on three different days. The results are presented in Table 3. Whatever the GEN concentration level, the overall results showed R.S.D. values lower than 14% in all experiments. Under the same conditions, the method proved to be accurate since GEN recovery was comprised between approximately 90 and 115%, even at the LLOQ. The difference between nominal and found concentrations of the standards demonstrated that the assay is accurate enough for its application and that the values were within acceptable limits. Such precision and accuracy results were in agreement with recommendations for bioanalytical assays (ICH, 2005).

Table 3. Precision, accuracy and recovery data for skin samples.

| Sample | GEN ($\mu\text{g/mL}$) | Intra-day | | Inter-day | | Recovery (%) |
|----------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------|
| | | Precision (RSD) ^a | Accuracy (%) ^b | Precision (RSD) ^a | Accuracy (%) ^b | |
| Receptor fluid | 0.1 (LLOQ) | 1.09 | -8.02 | 1.57 | -6.33 | 93.67 \pm 1.57 |
| | 1.0 | 0.34 | 10.88 | 0.44 | 10.65 | 110.65 \pm 0.44 |
| | 5.0 | 0.91 | -0.79 | 0.48 | -0.96 | 99.04 \pm 0.48 |
| | 10.0 | 0.22 | 1.06 | 1.60 | 0.62 | 100.62 \pm 1.60 |
| SC | 0.1 (LLOQ) | 3.21 | 14.05 | 5.49 | 13.43 | 113.43 \pm 5.49 |
| | 1.0 | 3.31 | 0.46 | 11.97 | 4.13 | 104.13 \pm 11.97 |
| | 5.0 | 2.34 | 14.06 | 7.92 | 9.52 | 109.52 \pm 7.92 |
| | 10.0 | 6.44 | 1.52 | 13.10 | 5.64 | 105.64 \pm 13.10 |
| Epidermis | 0.1 (LLOQ) | 2.07 | -10.51 | 8.29 | -9.91 | 90.09 \pm 8.29 |
| | 1.0 | 0.66 | -2.36 | 3.85 | -6.28 | 93.72 \pm 3.85 |
| | 5.0 | 0.21 | -1.72 | 2.35 | -4.62 | 95.38 \pm 2.35 |
| | 10.0 | 0.11 | -4.54 | 7.39 | 4.49 | 104.49 \pm 7.39 |
| Dermis | 0.1 (LLOQ) | 1.03 | -10.09 | 9.42 | -10.48 | 89.52 \pm 9.42 |
| | 1.0 | 0.15 | 2.64 | 5.54 | -1.29 | 98.71 \pm 5.54 |
| | 5.0 | 0.86 | -2.22 | 8.18 | -0.76 | 99.24 \pm 8.18 |
| | 10.0 | 0.19 | -3.42 | 11.15 | 9.05 | 109.05 \pm 11.15 |

^a Precision was expressed as relative standard deviation (RSD) of replicate measurements. ^b Accuracy was expressed as relative error of measurement. ^c The mean absolute recovery for each level was calculated from three GEN spiked replicates (RSD).

Method application

In the validated conditions, GEN permeation profile was evaluated from nanoemulsions exhibiting a mean droplet size in the sub 300nm range, whose formulations were recently described (VARGAS et al., 2010). GEN was assayed in skin samples (stratum corneum, epidermis, and dermis) after 8h of kinetics from nanoemulsions before and after their incorporation in hydrogels.

Regardless of the formulation, the GEN released reached all skin layers; however, only low amounts were detected in the stratum corneum ($<2.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Higher amounts of GEN were detected in the other skin layers, especially in the epidermis. GEN retention in the epidermis was significantly higher (*t*-test, $p<0.05$) from the hydrogel ($185\mu\text{g}/\text{cm}^2$) as compared to that from nanoemulsion before thickening ($143\mu\text{g}/\text{cm}^2$), suggesting the positive effect of the vehicle in the penetration of GEN through the skin layers.

Table 4. GEN detected in the porcine ear skin layers after 8h permeation.

| | GEN ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | | |
|--------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------|
| | Stratum Corneum | Epidermis | Dermis |
| Nanoemulsion | 2.52 ± 0.43 | 143.69 ± 39.11 | 11.26 ± 2.29 |
| Hydrogel | 0.44 ± 0.21 | 185.53 ± 29.76 | 21.09 ± 2.44 |

In conclusion, this article shows a useful LC method to determine, accurately and precisely, GEN released from formulations through the porcine ear skin layers. The GEN extraction from skin layers using methanol under ultrasonication allowed the recovery of up to approximately 100% of GEN from samples. Within the validated conditions, neither the excipient formulations nor the skin layer compounds interfered with the determination of GEN. In this light, this method allowed the detection of differences among GEN skin retention profiles from different formulations.

References

- AFAQ, F., MUKHTAR, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Experimental Dermatology*, n. 15, p. 678-684, 2006.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B*, v. 689, p. 175-180, 1997.
- DINKOVA-KOSTOVA A. T., Phytochemicals as Protectors Against Ultraviolet Radiation: Versatility of Effects and Mechanisms. *Planta Medica*, v. 74, p. 1548-1559, 2008.
- FDA (2001) Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville, USA.
- GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; WALDICEU, A. V. J.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of *in vivo* efficacy of topical formulations containing soybean extract. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 352, p. 189-196, 2008.
- HUANG, Z. R., HUNG, C. F., LIN, Y. K., FANG, J. Y. In vitro and in vivo evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 364, p. 36-44, 2008.
- IBERN-GOMEZ, M.; ANDRES-LACUEVA, C.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; WATERHOUSE, A. L. Rapid HPLC analysis of phenolic compounds in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 53, p. 218-221, 2002.
- ICH (2005) Steering Committee. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva, Switzerland.
- LIN, J. Y.; TOURNAS, J. A.; BURCH J. A.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; ZIELINSKI, J. Topical Isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatology, Photoimmunology e Photomedicine*, v. 24, p. 61-66, 2008.
- MESSINA, M., PERSKY, V., SETCHELL, K., BARNES, S. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutrition and Cancer*, v. 21, p. 113-131, 1994.
- MINGHETTI, P., CILURZO, F., CASIRAGHI, A., MONTANARI, L. Evaluation of ex vivo human skin permeation of genistein and daidzein. *Drug Delivery*, v. 13, p. 411-415, 2006.
- MOORE, J.O., WANG, Y., STEBBINS, W.G., GAO, D., ZHOU, X., PHELPS, R., LEBWOHL, M., WEI, H. Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B-induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 27, p. 1627-1635, 2006.
- SILVA, A. P. C, KOESTER, L. S., MAYORGA, P., BASSANI, V. L., TEIXEIRA, H. Development and validation of a LC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. *Pharmazie*, v. 62, p. 732-734, 2007.
- SILVA, A.P.C.; NUNES, B.R.; OLIVEIRA, M.C.; KOESTER, L.S.; MAYORGA, P.; BASSANI, L. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. *Pharmazie*, v. 64, p. 32-35, 2009.
- VÄNTTINEN, K., MÖRAVCOVA, J. Transdermal absorption of phytoestrogens. *Pharmazie*, v. 56, p. 711-717, 2001.

VARGAS, B.A., BIDONE, J. BORGHETTI, G., KOESTER, L.S., BASSANI, V.L., TEIXEIRA, H.F. Topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions: formulation and skin permeation/retention studies.

WEI, H., SALADARI, R., LU, Y., WANG, Y., PALEP, S. R., MOORE, J., PHELPS, R., SHYONG, E., LEBWOHL, M. G. Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. *Journal of Nutrition*, v. 133, p. 3811S-3819S, 2003.

CAPÍTULO III

Hidrogéis de uso tópico contendo nanoemulsões de genisteína.

Estudos de formulação e permeação/retenção cutânea

Neste segundo capítulo descrevemos o perfil de permeação e retenção da genisteína (GEN) nas diferentes camadas de pele de orelha suína a partir das nanoemulsões, antes e após a sua incorporação em hidrogéis de ácido acrílico. Em uma primeira fase, descrevemos as propriedades de nanoemulsões de GEN (1mg/mL) constituídas de um núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média (TCM) ou octildodecanol (ODD) estabilizado por lecitina de gema de ovo, obtidas através por emulsificação espontânea. Independentemente do núcleo oleoso, as formulações apresentaram-se monodispersas com potencial ζ negativo e baixa viscosidade. A fim de adequar a viscosidade das formulações ao uso tópico, as nanoemulsões foram incorporadas em hidrogéis de ácido acrílico. Os hidrogéis derivados apresentaram um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico. Na segunda fase do estudo, o perfil de permeação e retenção da GEN a partir das formulações foi avaliada utilizando-se as condições apresentadas no primeiro capítulo. Os estudos de permeação e retenção foram realizados em condições sink utilizando-se pele de orelha suína e células de difusão de Franz. Foi determinada a quantidade de GEN no estrato córneo, epiderme, derme e fluído receptor nos tempos de 2, 4, 6 e 8 horas. O perfil de permeação/retenção da GEN foi influenciado pela natureza do núcleo oleoso empregado. Após 8 h de cinética, nanoemulsões constituídas de um núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média apresentaram uma permeação mais lenta ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e uma maior retenção da GEN na epiderme ($143\mu\text{g}/\text{cm}^2$) quando comparado com nanoemulsões contendo octildodecanol (10 e $75\mu\text{g}/\text{cm}^2$) como núcleo oleoso. A incorporação das nanoemulsões de GEN em hidrogéis aumenta a retenção da GEN na epiderme (até $185\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Tal resultado pode estar relacionado com o aumento da hidratação da epiderme como sugerido nas observações histológicas.

Topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions: formulation and skin permeation/retention studies

Bethânia de Vargas, Juliana Bidone, Greice Borghetti, Leticia Scherer Koester, Valquiria Linck Bassani, and Helder Ferreira Teixeira*

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, Brazil

*Author to whom correspondence should be addressed:

helder@farmacia.ufrgs.br

Keywords: genistein, nanoemulsions, skin retention, validation

Abstract

The main purpose of this study was to evaluate the distribution of genistein (GEN) through the porcine skin layers from nanoemulsions, before and after their incorporation into acrylic-acid hydrogels. Nanoemulsions composed by GEN, egg lecithin, medium chain triglycerides (MCT) or octyldodecanol (ODD) and water were prepared by spontaneous emulsification procedure. Regardless of the oil core used, this procedure yielded monodisperse nanoemulsions in a sub 250nm range exhibiting negative ζ -potential and low viscosity. The amount of GEN associated with both formulations was close to 100 % (considering drug content of 1 mg/mL). The formulations were subsequently incorporated into acrylic-acid hydrogels in order to have their viscosity adjusted. The semisolid formulations obtained exhibit non-Newtonian pseudoplastic behavior. The permeation and retention of GEN from formulations was carried out using porcine ear skin mounted in Franz diffusion cells under sink conditions. The GEN permeation/retention profile was influenced by the nature of the oil core used. MCT-based nanoemulsions exhibit a slower permeation and a higher retention of GEN in porcine skin layers as compared to ODD-nanoemulsions. The incorporation of GEN-loaded MCT-nanoemulsion into hydrogels improved the GEN retention, especially in the epidermis (up to $185\mu\text{g}/\text{cm}^2$ after 8h of kinetics), which might be related to the increased hydration of epidermis as suggested in histological observations. Such results open interesting perspectives for the topical administration of GEN.

Introduction

The effect of soybean isoflavones on the protection of skin photoaging and carcinogenesis has been extensively investigated. Several studies have addressed the activity of genistein (GEN) (figure 1), one of the most abundant soybean isoflavones (MESSINA et al., 1994; WEI et al., 1998; WEI et al., 2003; KANG et al., 2003; AFAQ and MUKHTAR, 2006; MOORE et al., 2006). Wei and co-workers (2003) have recently reviewed the skin effect of topically administered GEN. It was shown that GEN inhibits both UV-induced skin carcinogenesis and photodamage in mouse skin and also protects human skin against UV-induced photodamage.

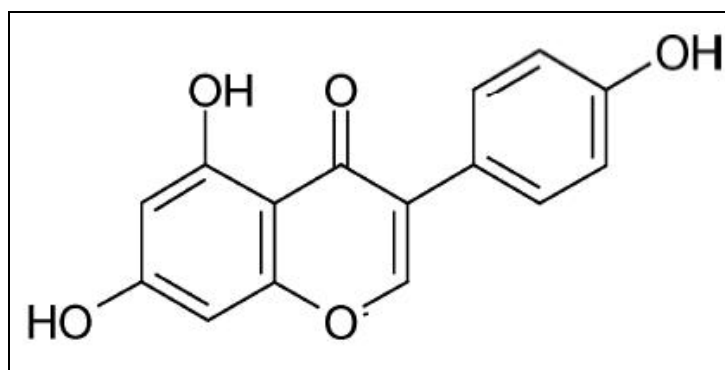


Figure 1. Chemical structure of GEN.

In spite of the increasing interest on the topical use of GEN, only few reports have described its skin permeation profile. Vanttinen and Möravcova (2001) have suggested the percutaneous absorption of GEN from an olive oil suspension through human skin by evaluating the isoflavone levels found in plasma and urine. Minghetti et al. (2006) have evaluated the effect *in vitro* of different permeation enhancers on GEN permeation through the human skin using modified Franz type diffusion cells. PEG 400 was considered as the most effective vehicle for the transdermal delivery of GEN. More recently, Huang et al. (2008) have shown the pH effect on GEN permeation and retention on nude mice skin using Franz cells. GEN in a neutral condition showed higher skin accumulation compared to the ionized condition, showing the lower penetration of the ionized form, due to the stratum corneum characteristics.

In spite of the potential interest in the use of GEN (and other flavonoids) on the dermatological field, the very poor water solubility of some nonglycosidic flavonoids could represent a major drawback. In this context, the design of nanoemulsions intended for the topical administration of flavonoids has recently been described (SILVA et al., 2007; FASOLO et al., 2009). In fact, such systems offer an interesting alternative to the administration of lipophilic molecules due to their effectiveness in drug solubilization, representing a potential for improving the efficacy and even the anticipated positive acceptance by patients due to its hydrophilic character (PIEMI et al., 1999; FERNANDEZ et al., 2000; ALVES et al., 2005; HOELLER et al., 2009; BASPINAR et al., 2009). Nanoemulsions are fine dispersions of well-tolerated lipids in water where the poorly-soluble drugs can be dissolved in the oil core and/or adsorbed on the oil–water interface of the nanoemulsions. The incorporation of drugs in such systems can increase the skin permeation rate and enhance the topical effect caused by prolonged residence time in the uppermost skin layers due to both the large surface area and the low surface tension of the nanodroplets (BENITA, 1998).

The development of GEN-loaded topical nanoemulsions is currently under study by our research group. Silva et al (2007) showed the efficient incorporation of GEN into nanoemulsions composed by an oil core of medium chain triglycerides or octyldodecanol stabilized by egg-lecithin obtained by means of the spontaneous emulsification procedure. This is consistent with partition coefficient of GEN (log P-value of 3.04) reported in previous literature (ROHTHWELL et al. 2005). Recently, a preliminary study concerning the GEN permeation profile from these nanoemulsions using porcine ear skin in Franz type diffusion cells was reported (SILVA et al., 2009). The results showed a slow permeation profile from both formulations, compared to the volatile reservoir, suggesting the affinity of GEN to the formulations. Up to now, however, studies concerning the distribution of GEN in the skin layers have yet to be performed. In this context, the main purpose of this study was to evaluate the GEN permeation/retention profile on porcine ear skin from topical nanoemulsions, before and after their incorporation into acrylic acid-hydrogels, in order to have their viscosity adjusted to topical applications.

Experimental

Chemical and reagents

Egg-lecithin (Lipoid E-80[®]) and medium chain triglycerides (MCT) were kindly donated by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Octyldodecanol (ODD) and triethanolamine were obtained from Delaware (Porto Alegre, Brazil). GEN and Carbopol 940 were purchased from Sigma (São Paulo, Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q apparatus (Millipore, Billerica, USA). Methanol LC grade was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The skin of pig ears were obtained from Dália do Brasil (Porto Alegre, Brazil).

Preparation of formulations

Nanoemulsions containing GEN were prepared using spontaneous emulsification procedure. The final composition (% w/w) of nanoemulsions, obtained in the absence (MCT or ODD) or in the presence of genistein (MCT/GEN or ODD/GEN) and after incorporation in hydrogels (H-MCT/GEN or H-ODD/GEN), was presented in table 1.

Table 1. Final composition (% w/w) of GEN-loaded nanoemulsions before and after incorporation into hydrogels.

| | MCT/GEN | H-MCT/GEN | ODD/GEN | H-ODD/GEN |
|---------------------------|---------|-----------|---------|-----------|
| GEN | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Egg-lecithin | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| MCT | 8.00 | 8.00 | - | - |
| ODD | - | - | 8.00 | 8.00 |
| Water q.s.p. | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| Carbopol 940 [®] | - | 0.50 | - | 0.50 |
| Triethanolamine | - | 0.20 | - | 0.20 |

MCT: medium chain triglycerides; ODD: Octyldodecanol; GEN: GEN

Briefly, this method consists of injecting an organic phase containing components of the oil core into the water phase under magnetic stirring. Subsequently, the organic solvent (ethanol) was removed by evaporation under reduced pressure at 40-45 °C. Typically, two kinds of formulations composed by either medium chain triglycerides or octyldodecanol as oil core were prepared. GEN was added to the ethanol phase in order to have a final concentration in nanoemulsions of 1mg/mL. Blank formulations were prepared in the same conditions in the absence of GEN as control formulations. For hydrogels containing GEN-loaded nanoemulsions, carbopol 940[®] was dispersed in water and was stirred at room temperature with magnetic stirrer. After this, the mixture was neutralized with triethanolamine to forming the gel at pH value of 6.0-7.0. Finally, 0.5g of the carbopol gel was mixed with 4.5g of nanoemulsion with continuous stirring to give a final concentration of 0.5%.

Characterization of nanoemulsions

The mean droplet size and ζ -potential of the nanoemulsions were determined at 25°C by photon correlation spectroscopy (PCS) and electrophoretic mobility, respectively (3000HS Zetasizer, Malvern Instruments, England). The samples were adequately diluted in water for size determinations or in 1 mM NaCl solution for ζ -potential measurements. The bulk pH of the nanoemulsions was directly recorded using a pH-meter B474 (Micronal, Brazil).

The viscosity was determined by capillary viscometry in Ostwald viscometer. Therefore, it was transferred to the viscometer a volume of 5 mL of each nanoemulsion. The tests were performed at 20 °C, taking into account the time of leakage of samples through the capillary and the relative viscosity was determined by equation 1:

$$\eta = k.t.\rho \quad \text{(Equation 1)}$$

Where: η = absolute viscosity (cP), k = constant of the viscometer; ρ = density of the fluid temperature of 20 ° C (g / mL) t = flow time(s). The constant value Ostwald (k) was determined experimentally ($k = 0.0212$), measuring the water flow time, and applying the formula specified the value (1.0087 cP) for water at 20 ° C.

Morphological examination of nanoemulsions was performed by means of transmission electron microscopy (TEM). The nanoemulsions were diluted at a 1:10 ratio, obtaining an oil phase concentration equal to 1%. Specimens for TEM visualization were prepared by mixing samples with one droplet of 2% (w/v) uranyl acetate solution. The samples were then adsorbed to the 200 mesh formvar-coated copper grids, left to dry, and examined by TEM (JEM-1200 ExII, Jeol, Japan).

Characterization of hydrogels

First, the morphological examination of nanoemulsions after incorporation in hydrogels was performed by means of TEM as described below, with an adequate sample dilution.

The rheological characterization of the hydrogel formulations was carried out using a Brookfiel LVLD-II+ rotational viscometer at room temperature with a shear rate from 0.5 to 20 rpm and decreasing it back to 0 rpm, respecting the limits of values of torque (above 10% and less than 100%). The spindle SC-27 was lowered perpendicularly into the gel placed in a Brookfiel dispositive to evaluate small quantities taking care that the spindle does not touch the bottom of the dispositive. After the rotation of the spindle was selected, samples of 10 g of hydrogels were analyzed for one minute in each speed until viscosity, shear stress and shear rates measurements were stable. The values of shear rates were plotted in function of shear stress to obtain the rheograms. For determination of the spreadability the gels were pressed between sequences of weights, for one minute each, with intervals of 30s between weights. The spreading areas reached by samples were measured. The results were expressed in terms of spreading area (mm) as function of the applied mass and the graphic of spreadability profiles were obtained by plotting the spreading area against weights.

Genistein content

The determination of GEN content in the nanoemulsions was carried out by using the conditions previously described by Silva et al. (2007). Aliquots of GEN-loaded nanoemulsion were appropriately diluted in methanol, filtered and analyzed by liquid chromatography. For association efficiency study, sample of nanoemulsions were added to ultrafiltration membranes (Ultrafree-MC 10,000 MW, Millipore) and centrifugated at 5,000rpm. Free GEN was determined in a clear ultrafiltrate obtained by separation of the water phase. For determination of GEN in hydrogels, similar liquid chromatography conditions were used.

Skin permeation and retention

GEN content in skin permeation/retention was assayed by liquid chromatography previously validated (VARGAS et al., 2010). In brief, the LC apparatus consisted of a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with a model LC-20AT pump, a SPD-20AV UV-VIS variable wavelength detector (set at 270 nm), a degasser DGU-20A5, a CBM-20A system controller, and SIL-20A injection valve with a 100 μ L loop. GEN was analyzed using a Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18 column (5 mm, 250 mm \times 4 mm i.d.). The mobile phase consisted of a methanol:water mixture (70:30 w/w) at pH 3.0 in isocratic flow. The LC system was operated at a flow rate of 1.2 mL/min, and the sensitivity was 0.5 AUFS, at room temperature. All calculations were performed with external standardization by measurement of peak areas. The method was linear (0.1-10.0 μ g/mL), precise, accurate and specific for GEN assay in skin permeation/retention studies.

Prior to permeation study, the GEN solubility was determined in phosphate buffer pH 7.4 containing or not increasing amounts of ethanol in order to select an appropriate receptor fluid obeying sink conditions. The fluid receptor chosen was prepared, filtered and degassed and the GEN content assayed by liquid chromatography in the conditions described below.

GEN permeation was assessed using Franz type diffusion cells which presented a surface area for diffusion of 1.77 cm² and a receptor volume of 10.0 ml. Excised circular pig ear skin was set between the donor and the receptor compartments, with the inner part facing the upper inside portion of the cell. Experiments were performed in sink conditions due to the presence of 30% ethanol in PBS as receptor phase. The bathing solution was kept under a controlled temperature (37 ± 1.0°C) and stirred. About 500µg of GEN-loaded nanoemulsions (containing GEN at 1mg/mL) were placed in the donor compartment, before and after their incorporation in hydrogels. Samples of 1.0ml were withdrawn at hourly intervals (2, 4, 6 and 8 h), and the same volume of fresh receptor fluid was added in order to keep a constant volume. The aliquots were diluted in methanol and analyzed by liquid chromatography. The results were expressed as mean ± standard deviation of permeated GEN per unit surface area (µg/cm²) as the time function (h).

At the end of the experiment (8h), the skin was removed from the cell and cleaned using a cotton swab. The first stripped tape was discarded, while the following 15 tapes were used for GEN assay. Next, the epidermis was separated from the dermis by submerging skin slices in water heated to 60°C for 45 seconds, using a scalpel. The dermis was perforated into tiny pieces and the layers were weighed and placed in the test tube. Results are expressed as mean±standard deviation of GEN retained per unit of area (µg/cm²) of three independent experiments and were analyzed by the Student t-test with p < 0.05 significance.

Histological analyses of the skin were made to observe possible influence of the different formulations tested on the cutaneous morphology. Before this analyses the skin were treated with each formulation for 8 hours, cleaned with a cotton swab and immersed in formaldehyde solution for its preservation. Subsequently the cuts of skin were dehydrated, embedded in paraffin and sectioned with a thickness of 6 µm. The color was made by Hematoxylin modified Gomory trichome stain. Finally, the skin tissue specimen were photographed and analysed by optical microscopy. Photographs were taken with an optical increase of 40-fold.

Results and Discussion

Formulation study

Table 2 exhibits the main physicochemical properties of both blank and GEN-loaded MCT or ODD-based nanoemulsions. Regardless of the oil core used, the mean droplet size was in a 230-250nm range with a polydispersity index lower than 0.25, which is in accordance with properties of nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification (SILVA et al., 2007; FASOLO et al., 2009; HATZIANTONIOU et al., 2007; PRIMO et al., 2008). ζ -potential of nanoemulsions presented negative values which can be attributed to the presence of negatively-charged phospholipids of egg-lecithin in the final pH of the formulations (BENITA, 1998). The incorporation of GEN into nanoemulsions tends to increase the ζ -potential values, partially suggesting, the location of GEN at the oil–water interface of nanoemulsions.

Table 2. Physicochemical properties of blank and GEN-loaded nanoemulsions.

| | Size (nm) | ζ -potential (mV) | Viscosity (cP) | pH |
|---------|--------------|----------------------------|-------------------|---------|
| MCT | 235±7 | -44±7 | 1.40±0.10 | 6.0±0.1 |
| MCT/GEN | 240±28 | -37±4 | 1.50±0.10 | 5.8±0.3 |
| ODD | 239±8 | -47±3 | 1.70±0.02 | 5.9±0.2 |
| ODD/GEN | 247±23 | -36±4 | 1.80±0.07 | 5.9±0.2 |

Formulations exhibited a low viscosity (1.4-1.8cP) which was slightly higher for ODD-based nanoemulsions as compared to MCT (Table 2). Therefore, the application of nanoemulsions on the skin is preferred when the viscosity has been adjusted as a semisolid dosage form. In this study, nanoemulsions were incorporated into acrylic acid hydrogels due to their extensive use in the pharmaceutical field. Figure 1 shows the transmission electron microscopy photomicrographs of MCT or ODD-based nanoemulsions before and after their incorporation into the hydrogels.

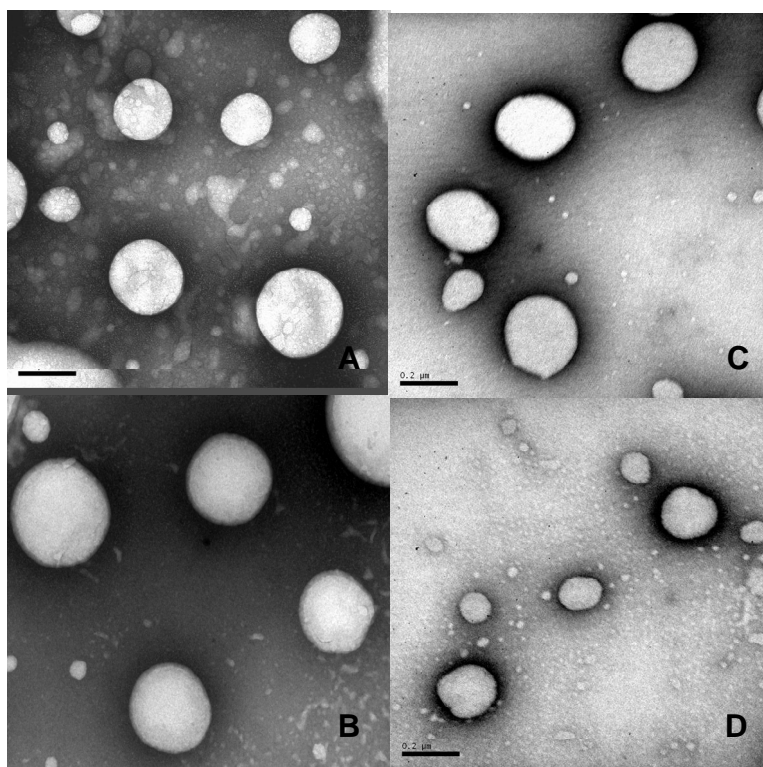


Figure 2. Transmission electronic microscopy images of hydrogel containig GEN-loaded MCT (A) or ODD (B) nanoemulsions at 1mg/mL. (C) and (D) are images from nanoemulsions before incorporation in hydrogels.

Transmission electron microscopy images showed the typical appearance of oil–water nanoemulsions (Figure 2A and 2B) with oil droplets displaying a size of nearly 200–300 nm, which is in accordance to the PCS experiments. The oil droplet size was also observed after their incorporation into the acrylic acid hydrogels because of the possible aggregation of the droplets, which may occur due to the potential interactions between charged groups of nanoemulsion surfactants and gel-forming polymers, as previously reported for lipid nanostructures (JENNING et al., 2000). Figure 2C and 2D shows individual oil droplets dispersed in the polymer network, exhibiting a droplet size that is quite similar to those detected before gel thickening, in turn indicating, under the conditions applied in this study, that the structure of nanoemulsions before being obtained as a semisolid preparation was in fact maintained.

The previous validation of an LC method allowed us to determine the GEN content in GEN-loaded nanoemulsions (SILVA et al., 2007). Table 3 shows that, whatever the oil core used, the GEN content was from 91% to 96%, considering an initial amount added of 1 mg/mL. The GEN association efficiency into nanoemulsions appears to be close to 100%, given that no free GEN was detected in the water phase obtained after separation by ultrafiltration membranes. This result was expected due to the low water solubility of isoflavone aglycones in the final pH of formulations. GEN molecules are in a non-ionized form in a pH that is nearly 6 (HUANG et al., 2008), which in turn favor GEN incorporation into the oil phase of nanoemulsions. Considering the association efficiency and the ζ -potential experiments (Table 2), the data follows in line with our previous results suggesting that GEN seems to be distributed in both the oil core and the interface of nanoemulsions (SILVA et al., 2009). After its incorporation into the hydrogels, the GEN content was quite similar (91-92%), considering that part of the water phase of the nanoemulsions was replaced by a concentrated hydrogel. In addition, GEN content remained quite similar after 30 days of storage at 4°C, indicating a satisfactory stability over a short period of time.

Table 3. GEN content (%)^a in nanoemulsions before and after incorporation in hydrogels (initial and after 30 days of storage at 4°C).

| | Nanoemulsions | | Hydrogels | |
|---------|---------------|------------|------------|------------|
| | Initial | 30 days | Initial | 30 Days |
| MCT/GEN | 93.00±2.00 | 97.66±1.97 | 92.00±3.00 | 92.48±2.31 |
| ODD/GEN | 96.00±1.00 | 93.94±1.57 | 91.00±6.00 | 92.55±4.42 |

^a For a GEN theoretical concentration of 1mg/mL

A rheological characterization of hydrogels containing GEN-loaded MCT or ODD nanoemulsions was also carried out (Figure 3). Early experiments showed that the incorporation of a nanocarrier decreases the viscosity of the acrylic acid hydrogel (data not shown), which may well be related to possible interactions of nanoemulsions with the polymer network.

Rheograms for hydrogels containing GEN-loaded nanoemulsions show that formulations present typical flow curves of non-Newtonian fluids, since their viscosities were not constant. Whatever the formulation, the behavior seems to be characteristic for pseudoplastic fluids, considering that apparent viscosity decreases instantaneously upon an increase in shear rate, as previous described in others studies that have reported the incorporation of nanoemulsions into hydrogels (ALVES et al., 2005). Under the conditions used in this study, the ascending and descending flow curves nearly overlap, suggesting no thyrrotrophic behavior (LEE et al., 2009). On the other hand, our results also showed a higher viscosity for GEN-loaded ODD-based nanoemulsions when compared to MCT nanoemulsions, which is similar to that reported in table 2 regarding nanoemulsions before their incorporation into hydrogels. These results may well be related to the higher viscosity of ODD (58-64 cP), as compared to MCT (25-33 cP) as oil cores of nanoemulsions (KIBBE, 2000; MELZER, 2000).

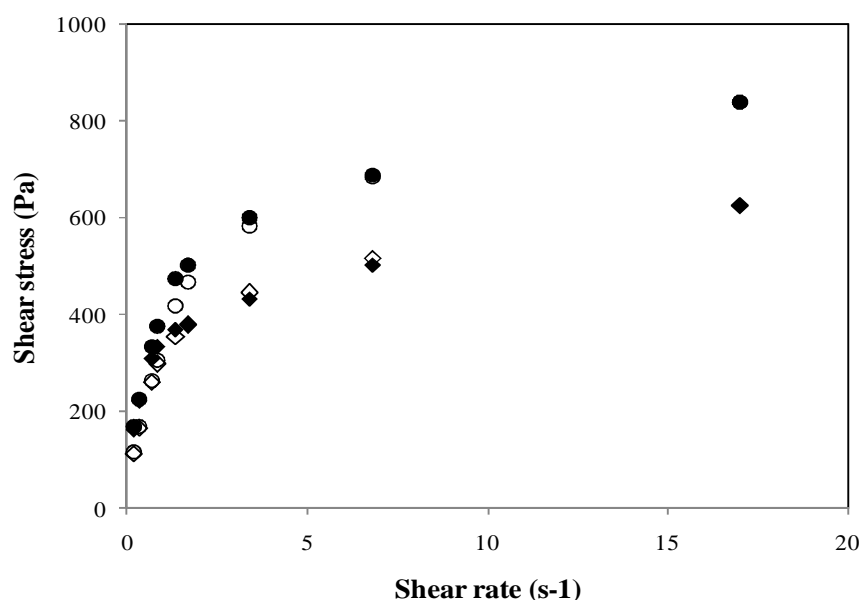


Figure 3. Representative rheograms curves of the hydrogels containing GEN-loaded ODD (●,○) or MCT (◇,◆)-nanoemulsions. Solid and open symbols represent ascendant and descendant curves, respectively.

The spreadability of the formulations was evaluated in this study as this is a relevant property of topical products related to the correct dosage to be transferred to the skin. Figure 4 shows the spreadability curves for hydrogels containing GEN-loaded nanoemulsions by means of the parallel plates method (LARDY et al., 2000). As can be seen, a progressive spreading of hydrogels containing both MCT and ODD-nanoemulsions was detected as a function of the applied mass. However, a higher spreadability (up to 8cm²) was detected for the MCT-based formulation as compared to the ODD formulation. Such result can be related to the higher viscosity of nanoemulsions containing ODD as an oil core (Figure 3).

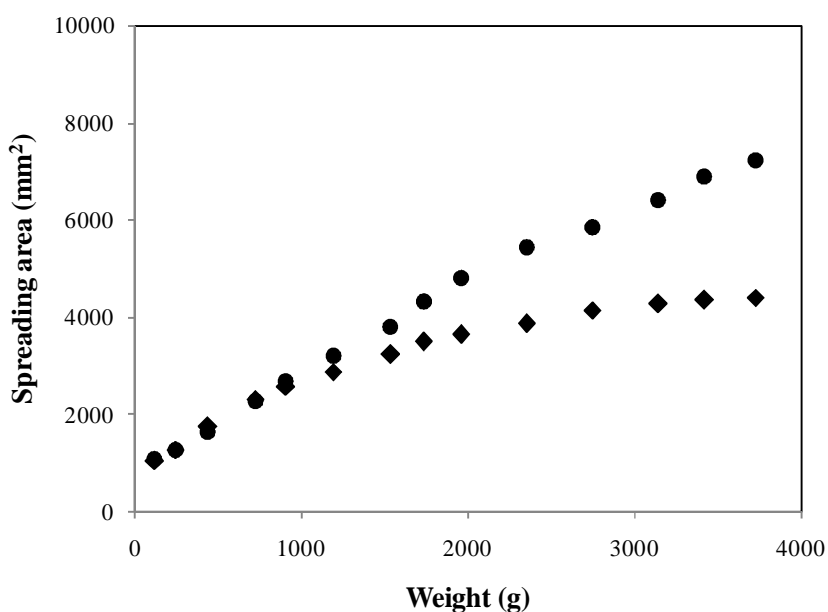


Figure 4. Representative spreadability curves of the hydrogels containing GEN-loaded ODD (●) or MCT (◆)-nanoemulsions.

Permeation/Retention study

Firstly, the GEN solubility was determined in different solvent mixtures (ethanol/PBS) to select an appropriate receptor phase to ensure skin conditions (table 4). Ethanol/PBS at a 70:30 ratio was chosen since the maximum concentration of GEN that could be reached in the receptor phase (50µg/µL), under the standard conditions employed in this study, corresponded to 23 % of its saturation concentration (214±8µg/mL).

Table 4. GEN solubility in different solutions.

| Solution | GEN solubility ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------------------|-------------------------------------|
| PBS 0.2M | 5.5 \pm 0.5 |
| PBS 0.2M:Ethanol (70:30) | 214.8 \pm 8.4 |
| PBS 0.2M:Ethanol (50:50) | 305.4 \pm 12.7 |

A cutaneous permeation/penetration profile implies several steps, including the release of a drug to the skin that will depend on the physicochemical properties of the drug itself combined with the influence of the vehicle used to alter the drug penetration profile (MOSER et al., 2001). In this study, *in vitro* skin permeation/penetration profiles of GEN from formulations was assessed using porcine ear skin mounted on Franz diffusion cells under sink conditions. The results concerning GEN permeation and retention from GEN-loaded nanoemulsions before and after their incorporation into hydrogels over time were presented in tables 5 and 6, respectively.

Table 5. Cumulative amount of GEN permeated ($\mu\text{g/cm}^2$) through excised porcine skin from nanoemulsions before and after their incorporation in hydrogels.

| | Nanoemulsions | | Hydrogel | |
|---|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | MCT/GEN | ODD/GEN | MCT/GEN | ODD/GEN |
| 2 | 0.704 \pm 0.047 | N.D. | 0.199 \pm 0.009 | 0.134 \pm 0.023 |
| 4 | 1.806 \pm 0.175 | N.D. | 0.203 \pm 0.020 | 0.113 \pm 0.023 |
| 6 | 3.401 \pm 0.271 | 7.259 \pm 0.760 | 0.248 \pm 0.023 | 0.267 \pm 0.119 |
| 8 | 5.339 \pm 0.462 | 10.092 \pm 0.789 | 0.251 \pm 0.118 | 0.143 \pm 0.017 |

N.D.: Not detected. Formulations contain GEN at 0.1% or 37mM.

GEN can reach the receptor compartment from both MCT and ODD-nanoemulsions (up to approximately 5 $\mu\text{g/cm}^2$ for MCT and 10 $\mu\text{g/cm}^2$ for ODD). Such result is in agreement with a favorable partition coefficient of GEN as well as the properties and the composition of nanoemulsions (oils and phospholipids). A significant difference (*t*-test, $p < 0.05$) exists between the oil cores used, which can be related to the skin

permeation enhancer effect of the ODD oil core and the higher affinity and solubility of GEN in the MCT oil core, as previously suggested (SILVA et al., 2009). The incorporation of GEN-loaded nanoemulsions in hydrogels significantly reduces ($p<0.05$) the GEN permeation throughout the skin. This can be explained by a lesser contact between the skin and the oil droplets of the nanoemulsion incorporated into hydrogels, most likely caused by the trapping of the droplets inside the acrylic acid polymer network. The distribution of GEN throughout the porcine skin layers (i.e. stratum corneum, epidermis, and dermis) from nanoemulsions before and after their incorporation into hydrogels was also evaluated under the validated conditions recently reported in the literature (VARGAS et al., 2010).

Table 6. Amount of GEN retained ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) through excised porcine skin from nanoemulsions before and after their incorporation in hydrogels.

| | | Nanoemulsions | | Hydrogel | |
|---|------------|---------------|-------------|--------------|--------------|
| | Skin layer | MCT | ODD | MCT | ODD |
| | SC | 0.88±0.23 | 1.08±0.58 | 0.77±0.36 | 1.24±0.67 |
| 2 | EPI | 37.94±14.41 | 5.18±2.19 | 53.40±9.80 | 71.53±21.36 |
| | DER | 9.62±8.07 | N.D. | 7.06±2.12 | 15.48±3.75 |
| | SC | 0.76±0.174 | 0.86±0.66 | 0.27±0.12 | 0.52±0.30 |
| 4 | EPI | 54.13±7.68 | 8.17±2.61 | 87.96±9.57 | 82.91±34.67 |
| | DER | 17.10±3.72 | N.D. | 11.81±2.16 | 23.46±4.32 |
| | SC | 0.79±0.24 | 1.51±0.70 | 0.04±0.03 | 1.77±2.50 |
| 6 | EPI | 45.72±6.88 | 32.66±7.62 | 143.12±41.11 | 112.74±16.83 |
| | DER | 11.42±7.11 | 11.32±2.44 | 18.25±6.06 | 17.04±2.95 |
| | SC | 2.52±0.43 | 1.84±0.65 | 0.44±0.21 | 0.66±0.18 |
| 8 | EPI | 143.69±39.11 | 75.13±39.27 | 185.53±29.76 | 103.85±20.40 |
| | DER | 11.26±2.29 | 21.39±5.08 | 21.09±2.44 | 21.56±3.40 |

N.D.: Not detected. Formulations contain GEN at 0.1% or 37mM.

Regardless of the formulation tested, before and after their incorporation in hydrogels, GEN is able to overcome the stratum corneum barrier once it was detected from all formulations, even to a lesser extent (Table 5). The highest GEN retention was detected in the epidermis. Moreover, the effect of the nanoemulsions's oil core on GEN retention in the epidermis can be clearly observed: a higher amount of GEN was detected for MCT-based nanoemulsions ($143 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), as compared to ODD-nanoemulsions ($75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), which may be related to the lower GEN permeation flow rate from MCT nanoemulsions (Table 4). After 8h of kinetics, there is a greater amount of GEN retained in the epidermis, regardless of the oil core, when nanoemulsions were incorporated into hydrogels. The GEN amount in the epidermis reached $185 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ when applied as a hydrogel containing GEN-loaded MCT nanoemulsions.

Finally, a histological evaluation of the skin was performed at the end of the permeation/retention studies (8h of kinetics) in an attempt to verify the effect of the different formulations on the skin. Figure 5A shows a photomicrograph of untreated skin (control), which represents the stratum corneum and the epidermis (top layer) stained in red, whereas the dermis is stained in blue (GOMORI, 1950). No significant differences in the thickness of the stratum corneum and the epidermis could be detected (Figures 5B and 5C) when the skin was treated with nanoemulsions. However, interesting observations could be detected when nanoemulsions were incorporated into hydrogels (Figures 5D and 5E). An increased thickness of the stratum corneum and the epidermis could be clearly observed, thus indicating an increased hydration of these skin layers. These findings most likely led to an improvement of the GEN retention in the epidermis, as discussed below (Table 5). Such retention considerations are in agreement with previous data obtained concerning other colloidal carriers dispersed in hydrogels (POPLE and SINGH, 2006).

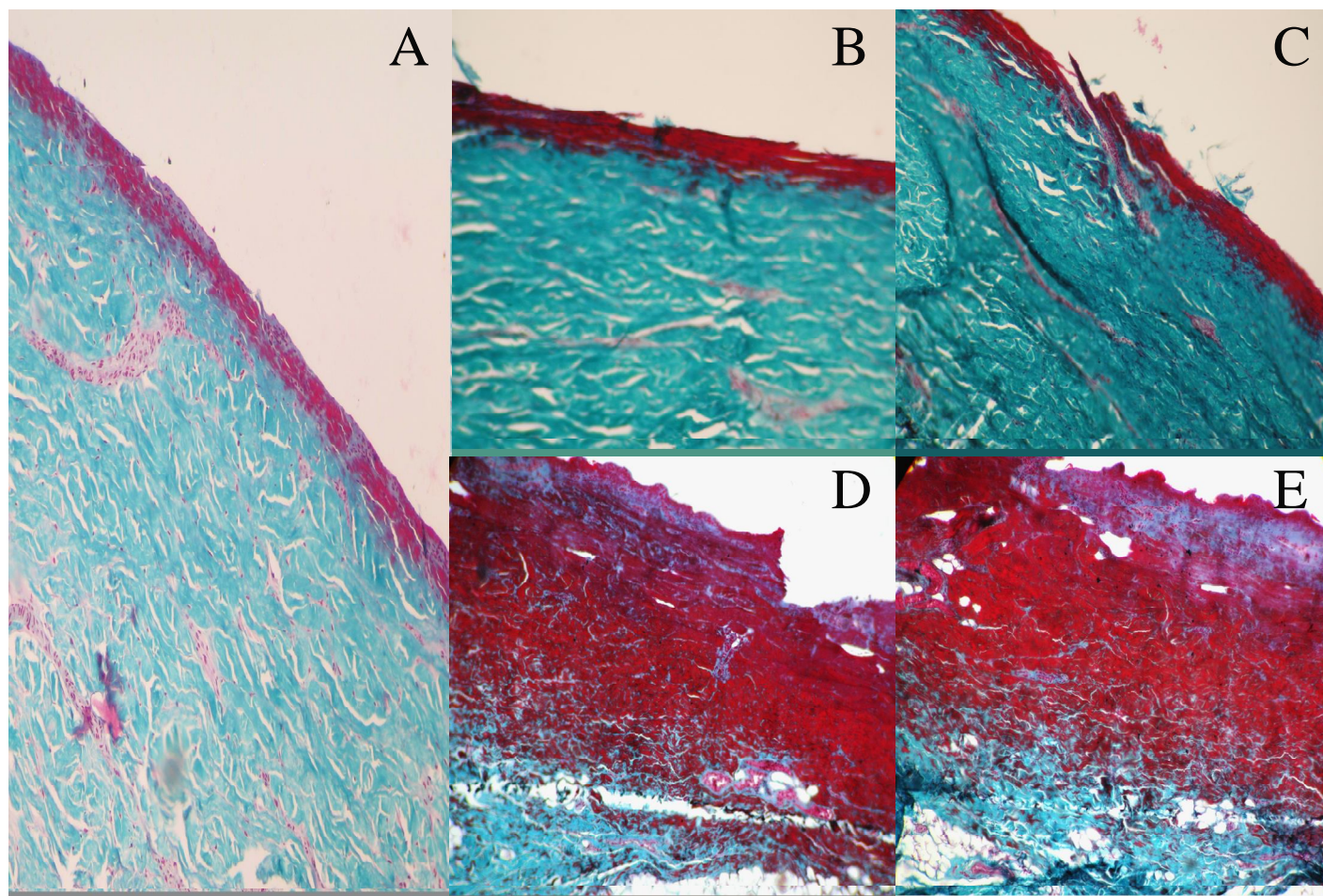


Figure 5. Phytomicrographs of skin after 8 h permeation kinetics (optical increase of 40-fold). Key: untreated skin (A); (B and C) Skin treated with GEN-loaded MCT or ODD nanoemulsions; (D and E) Skin treated with GEN-loaded MCT or ODD nanoemulsions incorporated in hydrogel.

Conclusion

The main physicochemical properties of GEN-loaded nanoemulsions remained quite similar, whatever the oil core used (MCT or ODD). Such observation underlines the effect of spontaneous emulsification conditions on the properties of nanoemulsions. The structure of the oil droplets seems to be maintained after incorporation of nanoemulsions into acrylic acid hydrogels. The semisolid formulations obtained exhibit non-Newtonian pseudoplastic behavior. The GEN permeation/retention profile was clearly influenced by the nature of the oil core used. MCT-based nanoemulsions exhibit both a slower permeation and a higher retention profile of GEN as compared to ODD-nanoemulsions. In addition to the effect of the oil core, the incorporation of GEN-loaded MCT-nanoemulsion into hydrogels improves the GEN retention, especially in the epidermis. Such a result might be related to the increased hydration of epidermis as showed in histological observations.

References

- AFAQ, F. and MUKHTAR, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Experimental Dermatology*, v. 15, p. 678-684, 2006.
- ALVES, M. P., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. *Pharmazie*, v. 60, p. 900-904, 2005.
- BASPINAR, Y., KECK, C.M., BORCHERT, H.H.. Development of a positively charged prednicarbate nanoemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, in press.
- BENITA, S. *Submicron Emulsion in Drug Targeting and Delivery*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.
- FASOLO, D., BASSANI, V. L., TEIXEIRA, H. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. *Pharmazie*, n. 64, p. 726-730, 2009.
- FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; RAMOS, J.; MAILLOLS, H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of in vitro and in vivo skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 155-165, 2000.
- GOMORI, G. A rapid one-step trichrome stain. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 20, p. 661-664, 1950.
- HATZIANTONIOU, S., DELI, G., NIKAS, Y., DEMETZOS, C. e PAPAIOANNOU G. Scanning electron microscopy study on nanoemulsions and solid lipid nanoparticles

containing high amounts of ceramides. *Microscopy in Nanobiotechnology*, v. 38, p. 819-823, 2007.

HOELLER S., SPERGER A. e VALENTA C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 370, p181-186, 2009.

HUANG, Z-R., HUNG, C-F., LIN Y-K., FANG J-Y. *In vitro* and *in vivo* evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 19, p. 36-44, 2008.

JENNING, V., SCHÄFER- KORTING, M., GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *Journal of Controlled Release* v. 66, p. 115-126, 2000.

KANG, S.; CHUNG, J.H.; LEE, J.H.; FISHER, G.J.; WAN, Y.S.; DUELL, E.A.; VOORHEES, J.J. Topical n-acetyl cysteine and genistein prevent ultravioletlight-induced signaling that leads to photoaging in human skin *in vivo*. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 120, p.835-841, 2003.

KIBBE, A. H. (Ed.). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.

LARDY, F., VENNAT, B., POUGET, M.MP., POURRAT, A. Funtionalization of hydrocolloids: principal component analysis applied to the study of correlations between parameters describing the consistency of hydrogels. *Drug Development Industrial Pharmacy* v. 26, p. 715-721, 2000.

LEE, C.H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of Controlled Release*, v. 136, p. 88-98, 2009.

MOSER, K., KRIWET, K., NAIK, A., KALIA, Y.N., GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* v. 52, p. 102-112, 2001.

MELZER, E. Herstellung und physikochemische Charakterisierung von w/o – Emulsionen unter Verwendung von Ethylcellulose als nichtionischen Polymeremulgator. *Tese de Doutorado*. Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina. Braunschweig, 2000.

MESSINA, M., PERSKY, V., SETCHELL, K., BARNES, S. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutrition and Cancer*, v. 21, p. 113-131, 1994.

MINGHETTI, P., CILURZO, F., CASIRAGHI, A., MONTANARI, L. Evaluation of *ex vivo* human skin permeation of genistein and daidzein. *Drug Delivery*, v. 13, p. 411-415, 2006.

MOORE, J.O., WANG, Y., STEBBINS, W.G., GAO, D., ZHOU, X., PHELPS, R., LEBWOHL, M., WEI, H. Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B-induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis. *Carconogenesis*, v. 27, p. 1627–1635, 2006.

PIEMI, M.P.Y.; KORNER, D.; BENITA, S.; MARTY, J-P. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. *Journal of Controlled Release*, v. 58, p.177-187, 1999.

POPLE P. V., SINGH K. K. Development and evaluated of topical formulation containing solid lipid nanoparticles of vitamin A. *AAPS PharmSciTech*, v. 7, 91, p e-63-e-69, 2006.

- PRIMO, F. L., RODRIGUES, M. M. A., SIMIONI, A. R., BENTLEY, M. V. L. B., MORAIS, P. C. e TEDESCO, A. C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 320, p. e211–e214, 2008.
- ROTHWELL, J. A., DAY, A. J., MORGAN, M. R. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *J Agricult Food Chem*, v. 53, p. 4355–4360, 2005.
- SILVA, A. P. C, KOESTER, L. S., MAYORGA, P., BASSANI, V. L., TEIXEIRA, H. Development and validation of a LC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. *Pharmazie*, v. 62, p. 732-734, 2007.
- SILVA, A.P.C.; NUNES, B.R.; OLIVEIRA, M.C.; KOESTER, L.S.; MAYORGA, P.; BASSANI, L. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. *Pharmazie*, v. 64, p. 32-35, 2009.
- VÄNTTINEN, K., MÖRAVCOVA, J. Transdermal absorption of phytoestrogens. *Pharmazie*, v. 56, p. 711-717, 2001.
- WEI, H.; BOWEN, R.; ZHANG, X.; LEBWOHL, M. Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two-stage skin carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 1509-1514, 1998.
- WEI, H. Isoflavone Genistein: Photoprotection and Clinical Implications in Dermatology. *The Journal of Nutrition*, v. 133, p. 3811S-3819S, 2003.

CONCLUSÕES

- O procedimento de emulsificação espontânea mostrou-se adequado para a obtenção de nanoemulsões de genisteína constituídas de um núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média ou octildodecanol estabilizados lecitina de gema de ovo.
- Independentemente do núcleo oleoso empregado, nas condições experimentais empregadas, foram obtidas nanoemulsões monodispersas com carga de superfície negativa e baixa viscosidade.
- A validação de uma metodologia de quantificação da genisteína por cromatografia líquida mostrou-se linear, precisa, exata e específica para a determinação do conteúdo de genisteína nas camadas da pele de orelha suína.
- As nanoemulsões de genisteína obtidas foram subsequentemente incorporadas em hidrogéis de ácido acrílico que apresentaram comportamento do tipo não-Newtoniano pseudoplástico.
- O perfil de permeação/retenção da genisteína foi influenciado pela natureza do núcleo oleoso empregado, sendo que nanoemulsões constituídas de um núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média apresentaram uma permeação mais lenta e uma maior retenção da genisteína quando comparado com as nanoemulsões constituídas de octildodecanol como fase interna.
- A incorporação das nanoemulsões em hidrogéis aumenta a retenção da genisteína nas camadas da pele, especialmente na epiderme, o que pode estar relacionado com o aumento da hidratação desta camada, sugerido nas observações histológicas.
- O conjunto dos resultados obtidos neste estudo demonstrou a influência da composição das nanoemulsões e da veiculação das mesmas em hidrogéis sobre as propriedades dos sistemas obtidos, bem como no perfil de permeação e retenção cutânea da genisteína *in vitro*.